



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Maturação em queijo dos Açores
Determinação de ácidos orgânicos e metabolismo do lactato

Isadora Barata Braz de Assunção Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientador: Professor Doutor António Pedro Louro Martins

Co-orientador: Engenheira Teresa Margarida Duthoit

Jurí:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2012

Agradecimentos

A todos aqueles que deram o seu contributo para a realização deste trabalho o meu mais profundo agradecimento.

Em particular ao Professor Dr. Pedro Louro por ter aceite ser meu orientador, pelos conhecimentos transmitidos, constante simpatia e disponibilidade.

À Eng.^a Margarida Duthoit pelo acompanhamento e apoio constantes, pela amabilidade, força e incentivo.

Ao Dr. Rui Miranda, Dra. Eugénia Marques, Dra. Ana Partidário, Eng.^a Cristina Saldanha, Nelson Rodrigues e Ana Sá Couto um obrigado por tudo.

Um agradecimento especial à Andreia, à Catarina e à Tânia pela companhia, boa-disposição e momentos bem passados. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.

A todos os meus amigos por estarem lá sempre que precisei, por todo o apoio, motivação e momentos bem passados. Um obrigado especial à Ana e ao Carlos.

À minha família, em especial aos meus pais, por tudo o que me ensinaram, pelo carinho, encorajamento e incentivo.

Resumo

As reacções secundárias que ocorrem durante a maturação do queijo envolvem transformações bioquímicas complexas que afectam as características finais do produto. O metabolismo do lactato é uma das vias de formação dos ácidos orgânicos em queijo, os quais podem influenciar de forma significativa o desenvolvimento das características sensoriais do produto durante a cura.

Neste trabalho foi estudada e desenvolvida a determinação e quantificação de ácidos orgânicos (acético, butírico, láctico, oxálico e propiónico) em queijo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A metodologia seleccionada foi aplicada ao estudo da evolução dos ácidos orgânicos ao longo da maturação de três tipos de queijos açorianos.

Concluiu-se que, de uma maneira geral, o teor em ácidos orgânicos aumentou ao longo da maturação, mas o teor e o respectivo perfil variaram em função do tipo de queijo, com os ácidos propiónico e butírico a revelarem-se mais significativos no queijo São Jorge. O tratamento dos dados com recurso à Classificação Hierárquica e à Análise em Componentes Principais mostrou que as amostras se agrupavam de acordo com a tecnologia de fabrico e com o tempo de cura.

Palavras-chave: queijo; maturação; ácidos orgânicos; HPLC; validação

Abstract

The secondary reactions that occur during the ripening of cheese involve complex biochemical changes that affect the final characteristics of the product. Organic acids can be originated from the metabolism of lactate and can significantly influence the development of the sensory properties of the cheese during ripening.

This work was carried out to study and develop an HPLC methodology to analyze and quantify organic acids (acetic, butyric, lactic, oxalic and propionic) in cheese. The evolution of the organic acids was then studied during the ripening of three Azorean cheeses.

It was concluded that, in general, the organic acids content increased over the cheese ripening and that the organic acids content and profile varied with cheese type; propionic and butyric acids are found to be the most significant in São Jorge cheese. The Cluster Analysis and the Principal Components Analysis showed that the samples were grouped according to manufacturing technology and ripening time.

Keywords: cheese; ripening; organic acids; HPLC; validation

Extended Abstract

The secondary reactions that occur during the ripening of cheese involve complex biochemical changes that affect the final characteristics of the product, such as flavour and texture. Organic acids can be originated from the metabolism of lactate and can significantly influence the development of the sensory characteristics of the cheese during ripening.

This work was carried out to study and develop an HPLC methodology to analyze and quantify organic acids (acetic, butyric, lactic, oxalic and propionic) in cheese. The evolution of the organic acids was then studied during the ripening of three Azorean cheeses. A comparison was also made with organic acids content and profile from Azeitão, Serra da Estrela and Ilha das Flores cheeses.

In the process of optimization and validation of the HPLC methodology it was concluded that the selected method was reliable and allowed satisfactory results. In general, there was an increase in the organic acids content throughout cheese ripening period. There were similarities between Moledo and São Jorge samples, but São Jorge cheese presented a higher total organic acids concentration, probably due to differences in manufacturing technology. Ilha Azul cheese revealed a lower organic acids content.

The acetic acid, lactic acid and oxalic acid increased throughout ripening period, but acetic acid in São Jorge cheese only increased until the 60th day with subsequent decline. Propionic and butyric acid were practically absent in Moledo and Ilha Azul cheeses and it was observed a more significant presence of these acids in São Jorge cheese. The Cluster Analysis and Principal Components Analysis showed that the samples were grouped according to the manufacturing technology and the ripening time.

It is suggested a future study to identify some peaks with a considerable dimension observed in the chromatograms and also to improve the method making it more expeditious.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Extended Abstract.....	iv
Índice de Quadros	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. O fabrico de queijo	3
2.1.1. Transformações gerais durante a maturação	4
2.1.1.1. Reacções primárias.....	5
2.1.1.2. Reacções secundárias	8
2.1.2. O metabolismo do lactato	8
2.2. Cromatografia HPLC	11
2.2.1. Determinação de ácidos orgânicos em queijo e algumas aplicações ao estudo do queijo	12
3. Material e Métodos	16
3.1. Amostras	16
3.2. Análises gerais aos queijos	18
3.3. Desenvolvimento e validação da metodologia para determinação de ácidos orgânicos em queijo por HPLC	20
3.3.1. Ensaio preliminares para selecção da fase móvel e do solvente de extracção.....	20
3.3.2. Procedimentos adoptados	21
3.3.3. Condições cromatográficas	22
3.3.4. Preparação da fase móvel para a determinação de ácidos orgânicos presentes em queijo por HPLC	23
3.3.5. Preparação das soluções-mãe e dos padrões de ácidos orgânicos	23
3.3.6. Preparação do solvente de extracção.....	24
3.3.7. Preparação das amostras de queijo para determinação de ácidos orgânicos por HPLC	24

3.4. Análise de resultados	24
4. Resultados e Discussão	26
4.1. Optimização da metodologia de determinação dos ácidos orgânicos em queijo	26
4.2. Evolução de ácidos orgânicos em queijos dos Açores.....	34
4.3. Perfil e teor em ácidos orgânicos em diferentes tipos de queijos.....	48
5. Conclusões	59
6. Referências bibliográficas.....	61
6.1. Outra Bibliografia Consultada.....	66
6.2. Cibergrafia.....	67
Anexos.....	68

Índice de Quadros

Quadro I - Valores mínimos e máximos de diferentes ácidos orgânicos em queijo Cheddar sul-africano	13
Quadro II - Tempo de cura e evolução das concentrações de ácidos orgânicos no “ <i>pickled white cheese</i> ”	14
Quadro III - Codificação das amostras de queijo Moledo	17
Quadro IV - Codificação das amostras de queijo Ilha Azul	17
Quadro V - Codificação das amostras de queijo Topo (São Jorge)	17
Quadro VI - Codificação das amostras de queijo Uniqueijo (São Jorge)	18
Quadro VII - Codificação das amostras de queijo das Flores (tipo Ilha)	18
Quadro VIII - Características da coluna utilizada no trabalho experimental	22
Quadro IX - Médias das áreas de ácido láctico e de ácido oxálico utilizadas para o Teste t-Student	28
Quadro X - Teste de homogeneidade de variâncias entre os três métodos de extração em estudo	28
Quadro XI - Diferenças significativas entre os três métodos de extração em estudo	28
Quadro XII - Gama de trabalho para os ácidos orgânicos em estudo	29
Quadro XIII - Valores dos coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração dos ácidos orgânicos	30
Quadro XIV - Limites de detecção obtidos para cada ácido orgânico em estudo	31
Quadro XV - Limites de quantificação para cada ácido orgânico em estudo	32
Quadro XVI - Valores dos declives (sensibilidade) obtidos para os cinco ácidos orgânicos em estudo	32
Quadro XVII - Valores de repetibilidade (mg/100g) obtidos para os ácidos orgânicos em estudo	33
Quadro XVIII - Percentagens de recuperação dos ácidos orgânicos	34
Quadro XIX - Análise de “clusters” com 5 grupos	50
Quadro XX - Análise de “clusters” com 6 grupos	51
Quadro XXI – ACP - Variância explicada por cada componente principal	53
Quadro XXII - Correlação entre as variáveis e as componentes principais	53

Índice de Figuras

Figura 1 - Vias do metabolismo do lactato durante a maturação do queijo	9
Figura 2 - Esquema de um sistema cromatográfico por HPLC.....	12
Figura 3 – Gráficos dos resíduos dos ácidos orgânicos estudados.....	30
Figura 4 – Evolução do teor total em ácidos orgânicos nos queijos Moledo, Ilha Azul e São Jorge	36
Figura 5 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico e acético em queijo Moledo	38
Figura 6 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico e acético em queijo Ilha Azul	40
Figura 7 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico, acético, propiónico e butírico em queijo São Jorge.....	42
Figura 8 - Cromatogramas relativos a amostras de queijo Ilha Azul, com 1 e 19semanas, com destaque para os dois grandes picos não identificados	46
Figura 9 - Cromatogramas relativos às amostras de queijo São Jorge Uniqueijo com 15 e 120dias de maturação, com destaque para os dois grandes picos não identificados.....	47
Figura 10 – Evolução da área dos picos não identificados ao longo da maturação em queijo São Jorge Uniqueijo.....	48
Figura 11 - Classificação Hierárquica – agregação das amostras a partir da composição em ácidos orgânicos dos diferentes tipos de cura.....	49
Figura 12 - ACP - Representação gráfica dos valores próprios em função do número de ordem da componente principal	52
Figura 13 - Projecção das variáveis e das amostras sobre o plano definido pela primeira e segunda componentes principais	54
Figura 14 - Projecção das variáveis e das amostras sobre o plano definido pela primeira e terceira componentes principais	55
Figura 15 - Projecção das variáveis e das amostras sobre o plano definido pela segunda e terceira componentes principais	56

Lista de abreviaturas

ACP – Análise em Componentes Principais

CH – Classificação Hierárquica

CP – Componente Principal

HPLC – High-performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

NSLAB – “non starter lactic acid bacteria” (bactérias lácticas não adicionadas)

1. Introdução

O desenvolvimento das características sensoriais do queijo durante a maturação é um tema que tem sido objecto de estudo devido às diversas vias de aparecimento das diferentes características e ao seu carácter inconstante. As características sensoriais do queijo resultam de um grande número de reacções bioquímicas, tendo como base ou substrato os componentes lácteos retidos no queijo e, como agentes, microrganismos e enzimas que as determinantes da tecnologia de fabrico seleccionam.

Tem sido efectuada uma pesquisa extensiva de modo a encontrar e avaliar os parâmetros bioquímicos e microbiológicos pelos quais o queijo pode ser classificado (Adda *et al.*, 1982; Farkye e Fox, 1990; Seitz, 1990).

O flavour do queijo pode ser formado através de diferentes meios, podendo ser influenciado por diversas substâncias, como sejam os ácidos orgânicos (Seitz, 1990; Urbach, 1993). Os ácidos orgânicos são compostos importantes do flavour da maioria dos queijos curados e que podem ser formados através da lipólise, pelos processos metabólicos, pelo crescimento bacteriano ou pela adição de acidificantes durante o fabrico (Adda *et al.*, 1982; Bevilacqua e Califano, 1989; Akalin *et al.*, 2002; Izco *et al.*, 2002).

Devido à dificuldade na separação e identificação dos ácidos orgânicos, torna-se difícil compreender em pleno o seu papel no processo de maturação do queijo. A detecção e quantificação de ácidos orgânicos em queijos pode contribuir para uma melhor compreensão do fenómeno de maturação, sendo nesta fase do fabrico que ocorrem diversas reacções bioquímicas importantes no desenvolvimento de compostos do flavour. As principais são a proteólise, a lipólise e a glicólise. Os produtos formados a partir destas reacções podem ainda dar origem a reacções secundárias, tais como o catabolismo dos ácidos gordos, o catabolismo dos aminoácidos ou o metabolismo do lactato.

A fermentação da lactose e do lactato durante a maturação contribui para o desenvolvimento das propriedades organolépticas dos queijos (Choisy *et al.*, 1987). Estas reacções têm sido menos estudadas e, no entanto, também possuem um papel essencial no desenvolvimento das propriedades finais do queijo.

Um dos objectivos principais deste trabalho foi a validação e optimização de uma metodologia de determinação de ácidos orgânicos em queijo. A aplicação da metodologia seleccionada foi depois aplicada a alguns tipos de queijo, com um objectivo mais geral de tipificar a influência da tecnologia de fabrico no perfil de ácidos orgânicos de queijos nacionais.

Assim, um outro objectivo do presente trabalho consistiu na detecção e quantificação de ácidos orgânicos em diferentes tipos de queijos através de uma cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC, incidindo essencialmente sobre os queijos de diferentes tipos oriundos dos Açores. Pretendeu-se ainda analisar a evolução de diferentes ácidos orgânicos ao longo de diversos estados de maturação em queijos dos Açores.

Para um estudo mais aprofundado foi feita uma caracterização dos queijos através de algumas análises físico-químicas, tendo todo o trabalho experimental sido desenvolvido na Unidade de Investigação de Tecnologia Alimentar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB, IP), recentemente substituído pela designação Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O fabrico de queijo

O fabrico de queijo remonta há milhares de anos, podendo ser considerado como um processo de conservação do leite. A sua produção é possível através da coagulação e dessoramento do leite cru ou pasteurizado ou ainda do leite total ou parcialmente desnatado, da nata, do leitelho ou da mistura de alguns ou de todos estes produtos sem ou com adição de outros géneros alimentícios, como seja o caso do sal (Martins, 2009).

Ao contrário da maioria dos lacticínios o queijo é um produto biológica e bioquimicamente dinâmico e, consequentemente, é inerentemente instável (Fox e McSweeney, 2004).

Para a obtenção de um produto final de qualidade é importante partir de uma matéria-prima de qualidade. A composição física, química e microbiológica, assim como as características sensoriais do leite têm influência sobre a composição e características finais do queijo.

As características do queijo são muito influenciadas pelas do leite utilizado no seu fabrico, pela raça do animal e sua alimentação, assim como pela própria tecnologia de fabrico (Canada, 1998). A classificação do queijo pode ser feita com base em diversos factores como a espécie produtora, o tipo de cura, a consistência, o teor em matéria gorda e a tecnologia de fabrico. Mas, na realidade, são as determinantes tecnológicas aquelas que diferenciam mais os tipos de queijo, realçando a importância de se considerar uma classificação tecnológica do queijo, como referem diversos autores (Mietton *et al.*, 2004).

Na verdade, o ciclo de fabrico do queijo engloba diversas etapas, sendo que o fabrico propriamente dito pode durar entre 5 a 24 horas, enquanto o período de maturação pode ir de 2 semanas a 2 anos, dependendo do tipo de queijo que se pretende obter. A preparação do leite é a primeira fase do processo. Nesta fase é efectuada uma selecção do leite de melhor qualidade química e microbiológica, seguida de uma pasteurização, se for o caso, que se destina a eliminar microrganismos ou enzimas que seriam prejudiciais ao processamento do queijo, ou, no caso das bactérias patogénicas, ao consumidor (Scott, 1986).

A flora adventícia presente no leite é muito heterogénea mas, no geral, as bactérias lácticas são benéficas, sendo responsáveis pela produção de ácido láctico e tendo um impacto positivo na maturação de queijos feitos a partir de leite cru. No entanto, também podem ser responsáveis pela maior variabilidade que os queijos de leite cru geralmente apresentam.

Actualmente a maioria dos queijos feitos a partir de leite pasteurizado são adicionados de fermentos lácteos de forma a promover a acidificação do leite.

Após a acidificação ocorre a coagulação da caseína. Para tal é adicionado coagulante de origem animal ou, nalguns casos, de origem vegetal, de forma a formar-se um gel que, posteriormente, será cortado, havendo ruptura do gel e a retirada do soro – dessoramento. Em seguida o queijo é submetido a uma prensagem cujo principal objectivo é reduzir o teor de água e, após esta etapa, segue-se a salga e, por fim, a cura ou maturação.

Apesar de todos os queijos terem o mesmo esquema geral de fabrico, há algumas variações consoante o tipo de queijo que se pretende obter, sendo a etapa de maturação aquela que mais contribui para essas diferenças, nomeadamente no que diz respeito ao tempo de cura, à temperatura e às condições de humidade da sala de cura. No entanto, esta fase depende muito das anteriores e, até, da matéria-prima e do tipo de preparação da mesma, pois são fases tenológicas que determinam as condições físicas, químicas e biológicas do queijo que vai curar.

2.1.1. Transformações gerais durante a maturação

Durante o período de maturação ocorrem transformações bioquímicas complexas e que afectam as características do queijo. No entanto, devido à natureza heterogénea deste produto, algumas reacções que ocorrem durante o processo de maturação não foram ainda bem estudadas.

As reacções bioquímicas primárias que ocorrem envolvem o metabolismo da lactose residual – glicólise, a proteólise e a lipólise. Também ocorrem reacções secundárias mas não menos importantes, tais como o catabolismo dos ácidos gordos, o catabolismo dos aminoácidos e o metabolismo do lactato.

A nível organoléptico os acontecimentos mais evidentes que têm lugar durante a maturação são a formação de uma crosta ou casca, de uma pasta homogénea e suave, de uma cor que pode ir desde o branco ao amarelo, e a formação de olhos ou fissuras (Spreer, 1991). Um dos factores determinantes na maturação é o ambiente de cura, as condições de armazenamento dos queijos, nomeadamente a temperatura e a humidade relativa do ar da sala de cura.

Os agentes de cura têm diversas origens, o leite, o coagulante, os microrganismos que se encontram na pasta que podem ter origem no leite, nos fermentos adicionados, na atmosfera dos locais de fabrico ou no próprio material da queijaria, pertencendo a espécies e a grupos muito diferentes (Choisy *et al.*, 1987).

A microflora que está associada à maturação é bastante diversificada, no entanto, pode ser dividida em dois grupos principais, o das bactérias lácticas de arranque (*starters*) e o da microflora secundária. Enquanto o primeiro grupo tem como função produzir ácido suficiente para reduzir rapidamente o pH do leite durante a etapa de fabrico, o segundo grupo actua, juntamente com o primeiro, no processo de maturação. A microflora secundária pode englobar desde bactérias lácticas, não adicionadas através dos fermentos lácticos, designadas por NSLAB (*“non-starter lactic acid bacteria”*), às bactérias propiónicas ou a fungos e leveduras. Serão estes microrganismos que irão contribuir de forma positiva para a cura do queijo, quer de uma forma mais directa através da sua actividade metabólica ou indirectamente através da libertação de enzimas na matriz do queijo.

O aroma e sabor (ou propriedades olfacto-gustativas) do queijo podem ter origem em transformações microbianas, enzimáticas ou químicas que ocorram durante este período. Substâncias como os ácidos orgânicos, compostos sulfúricos, lactonas, cetonas, álcoois e substâncias fenólicas podem influenciar os perfis de aroma e sabor dos queijos (Seitz, 1990; Urbach, 1993).

Os ácidos orgânicos podem ter diversas origens, podendo ser formados a partir do catabolismo dos aminoácidos ou dos triglicéridos, pela acção de bactérias de arranque, da microflora secundária ou de bactérias propiónicas. A detecção e quantificação de ácidos orgânicos pode ser utilizada como parâmetro de classificação de diferentes queijos e a presença destes compostos pode reflectir o estado do metabolismo microbiano (Bevilacqua e Califano, 1992; Lues, 2000; Garde *et al.*, 2012).

2.1.1.1. Reacções primárias

As moléculas responsáveis pelo cheiro dos queijos provêm da quebra de três componentes do leite, a caseína, os triglicéridos e a lactose. Os compostos voláteis formados dependem dos microrganismos que actuam como agentes de cura, mas também de outros factores como o tipo de leite utilizado.

As três reacções primárias que ocorrem durante a maturação e possuem um papel importante no desenvolvimento das características finais do queijo designam-se por glicólise, proteólise e lipólise. Os produtos obtidos das reacções primárias constituem substratos para outros sistemas enzimáticos e podem ser transformados em produtos secundários.

Glicólise

Apesar do leite conter lactose, um queijo que tenha sofrido maturação não contém quantidades apreciáveis de lactose, uma vez que esta é perdida no soro durante o fabrico ou é convertida em ácido láctico ou lactatos durante o processamento (Scott, 1986). A pouca lactose que ainda possa existir é transformada em ácido láctico logo no início da maturação, ocorrendo normalmente logo nas primeiras 24 horas. Consequentemente, verifica-se um abaixamento do pH.

A redução do pH do queijo afecta a sua composição, a retenção de cálcio e do coagulante e previne o crescimento de bactérias indesejáveis. No entanto, comparando com a proteólise, os compostos associados à glicólise não parecem contribuir significativamente para as propriedades do queijo como a textura ou o aroma (Law, 1987).

Os principais agentes responsáveis pela conversão da lactose a ácido láctico são as bactérias lácticas, distinguindo-se as homofermentativas das heterofermentativas.

As bactérias lácticas homofermentativas podem formar quantidades apreciáveis de ácido láctico e pequenas quantidades de produtos secundários, enquanto as bactérias heterofermentativas, para além do ácido láctico, podem ainda produzir quantidades razoáveis de ácido acético, etanol, CO₂, diacetil, entre outros produtos minoritários.

Posteriormente o ácido láctico sofre transformações secundárias, dando origem a novos produtos que muito contribuem para o desenvolvimento do aroma e sabor do queijo. Também os coliformes podem converter a lactose em ácido acético, ácido fórmico, CO₂ e H₂, enquanto as leveduras poderão transformar este açúcar em álcool, ácidos orgânicos, acetaldeído, entre outros produtos secundários minoritários.

Proteólise

É o acontecimento bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação e é determinante para o desenvolvimento da textura do queijo, contribuindo ainda para a formação do aroma e sabor. A proteólise é a quebra da caseína, a proteína principal presente no leite, em péptidos sucessivamente de cadeia mais curta e, posteriormente, em aminoácidos.

Pesquisas recentes indicam que o papel principal da proteólise na formação do aroma e sabor é a produção de aminoácidos que actuam como precursores de uma gama de reacções catabólicas que produzem diversos compostos voláteis do flavour (Fox *et al.*, 2004; McSweeney e Sousa, 2000; Yvon e Rijnen, 2001).

O desenvolvimento da textura do queijo pode ocorrer por via da matriz de proteínas, diminuição do a_w ou, então, indirectamente através de um aumento do pH causado pela libertação de amónia dos aminoácidos produzidos por proteólise. A formação do aroma e sabor pode dar-se directamente através da produção de pequenos péptidos e aminoácidos ou, indirectamente, pela libertação de aminoácidos que actuam como substratos de diversas reacções catabólicas.

A reacção de proteólise pode ser catalisada por proteinases e peptidases, com origens diferentes, como o coagulante, pela flora adventícia do leite ou pela microflora secundária. As bactérias lácticas presentes na flora adventícia do leite contêm uma proteinase que contribui para a cura do queijo através da hidrólise de péptidos de pequena e média dimensão produzidos a partir da caseína pela acção de coagulantes como a quimosina ou a plasmina.

As bactérias lácticas associadas à flora adventícia do queijo crescem ao longo da maturação. As proteinases e as peptidases destas bactérias são geralmente semelhantes às da flora adventícia e contribuem para a cura de um modo semelhante.

Em algumas variedades de queijo é encorajado o desenvolvimento de microflora secundária, a qual, por vezes, é deliberadamente adicionada. A maioria destes microrganismos contém uma actividade enzimática forte, incluindo proteinases e peptidases que contribuem substancialmente para a proteólise nestes casos.

Lipólise

Os lípidos presentes nos alimentos podem sofrer degradações oxidativas ou hidrolíticas (McSweeney e Sousa, 2000). No entanto, a oxidação não possui um papel significativo no queijo, provavelmente devido ao seu baixo potencial redox (Fox e Wallace, 1997; Fox *et al.*, 2000; McSweeney e Sousa, 2000).

A lipólise é o nome que se dá ao fenómeno que ocorre quando a quebra dos triglicéridos, os principais constituintes da gordura do leite, a qual dá origem a ácidos gordos, havendo formação de compostos que contribuem para o aroma e sabor dos queijos. São originados ácidos carboxílicos que são a fonte de diversas moléculas responsáveis por diversos odores.

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas como esterases e lipases, sendo que as lipases no queijo podem ter seis origens diferentes: o leite, o coagulante, as bactérias de arranque, os microrganismos secundários, as bactérias lácticas “NSLAB” e preparações de

lipases exógenas (Deeth e Fitz-Gerald, 1995; Fox e Wallace, 1997; McSweeney e Sousa, 2000).

Os ácidos gordos podem sofrer transformações secundárias, actuando como precursores de outros compostos que também contribuem para o aparecimento de novos cheiros e sabores no queijo.

2.1.1.2. Reacções secundárias

As principais reacções secundárias que ocorrem durante o processo de maturação são o catabolismo dos ácidos gordos, o catabolismo dos aminoácidos e o metabolismo do lactato.

Pela sua relevância no presente trabalho, o metabolismo do lactato será tratado mais em pormenor noutro ponto do trabalho.

Catabolismo dos ácidos gordos

Após a conversão dos triglicéridos em ácidos gordos, estes podem sofrer transformações secundárias e dar origem a diversos compostos responsáveis pelo aroma e sabor característicos de alguns queijos. Os ácidos gordos são precursores de muitos compostos do aroma e do sabor, tais como cetonas, lactonas, esteres, alcanos e álcoois secundários (Fox *et al.*, 2004).

Os compostos obtidos irão depender da via seguida, visto haver diversos caminhos possíveis de catabolismo dos ácidos gordos.

Catabolismo dos aminoácidos

O catabolismo dos aminoácidos também tem um papel determinante no desenvolvimento do aroma e sabor do queijo.

Pela sua importância para as propriedades olfacto-gustativas do queijo, as vias mais relevantes são o catabolismo da metionina, dos aminoácidos aromáticos e da clivagem das cadeias laterais dos aminoácidos (Fox *et al.*, 2004). Alguns dos compostos obtidos, com grande importância na formação do aroma e sabor, são os álcoois, os aldeídos, as aminas e os ácidos orgânicos.

2.1.2. O metabolismo do lactato

A fermentação láctica intervém na formação de alguns compostos do aroma, tais como o etanol, o acetaldeído e o diacetil. Mas é provavelmente a posterior degradação do lactato

que maior contribuição tem no desenvolvimento das características finais do queijo. O lactato pode ser metabolizado através de diferentes vias.

Na maioria dos queijos, o L-lactato é convertido, por racemização, em D-lactato pela flora adventícia, incluindo as bactérias NSLAB. Na presença de O_2 e de *pediococci*, o lactato pode ser oxidado a formiato e acetato

Nos queijos do tipo Camembert e Brie o lactato é catabolizado pela acção do *Penicillium camemberti* a CO_2 e H_2O .

Nos queijos do tipo Suíço, o lactato é catabolizado pelas bactérias propiônicas, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*, originando compostos determinantes no desenvolvimento do aroma e sabor e dos olhos característicos destes tipos de queijo.

O lactato pode ainda ser metabolizado anaerobicamente pela bactéria *Clostridium tyrobutyricum*, conduzindo ao defeito conhecido como flato ou opado tardio (Fox *et al.*, 2004).

A Figura 1 ilustra as cinco vias pelas quais o lactato pode ser metabolizado durante a maturação.

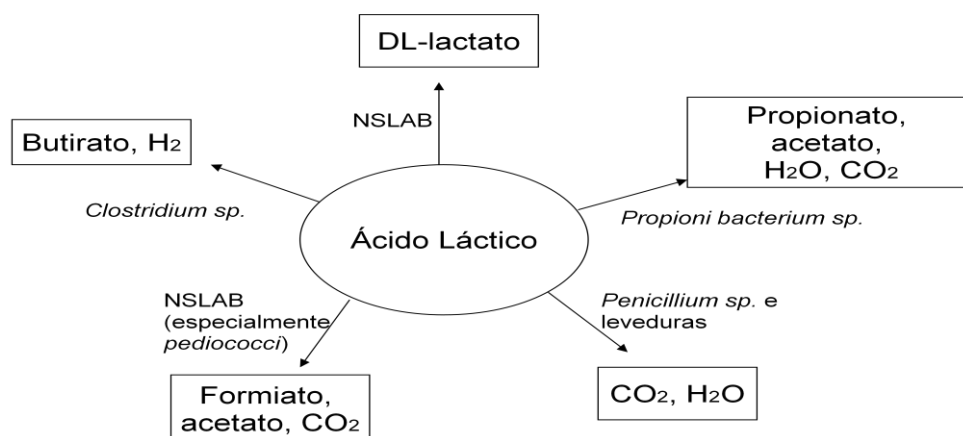


Figura 1 - Vias do metabolismo do lactato durante a maturação do queijo
(adaptado de Fox *et al.*, 2004)

É mais provável que a racemização do L-lactato ocorra de forma mais rápida em queijos feitos a partir de leite cru do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado. Isto ocorre devido à maior quantidade de bactérias lácticas NSLAB associada a uma maior diversidade destas bactérias. A racemização envolve a oxidação do L-lactato a piruvato pela L-lactato desidrogenase. O piruvato é posteriormente reduzido a D-lactato pela D-lactato desidrogenase. A racemização do lactato não é das principais vias que originam compostos

do aroma e sabor, no entanto pode ocorrer a formação de cristais de lactato de cálcio originando manchas brancas à superfície do queijo (Pearce *et al.*, 1973; Severn *et al.*, 1986; Dybing *et al.*, 1988). Este fenómeno não é prejudicial ao consumidor, mas pode gerar, no entanto, a rejeição do produto.

O lactato pode também ser metabolizado a acetato, etanol, formiato e CO₂ pela acção de bactérias lácticas. Se estiverem presentes no queijo grandes quantidades de O₂ e *Pediococci*, estas bactérias podem produzir 1 mol de acetato e 1 mol de CO₂ e consumir 1 mol de O₂ por mol de lactato utilizado (Thomas *et al.*, 1985).

O pH óptimo para a oxidação do lactato depende da sua concentração no queijo e a oxidação só se inicia quando toda a lactose presente no queijo foi consumida. Thomas (1986) estudou a actividade oxidativa de suspensões de bactérias de arranque e NSLAB isoladas de queijo em diferentes meios, lactose, lactato, citrato, aminoácidos e péptidos. Os microrganismos que conseguiram oxidar o lactato foram *Lb. brevis* e *P. pentosaceus*.

Nos queijos curados revestidos de bolores, como o Camembert ou o Brie, o catabolismo do lactato é bastante extenso (Fox *et al.*, 2004). A microflora secundária coloniza rapidamente a superfície destes queijos (Addis *et al.*, 2001).

O lactato é rapidamente metabolizado a CO₂ e H₂O pela acção de *G. candidum* e *P. camemberti*, causando um aumento no pH da superfície até ao centro da matriz. Quando o lactato se encontra todo consumido, a *P. camemberti* metaboliza as proteínas, o que origina a formação de NH₃ e consequentemente um aumento do pH. A elevação do pH estimula a acção da plasmina que, em conjunto com o coagulante residual, é responsável pela proteólise (Fox *et al.*, 2004). O metabolismo oxidativo do lactato e a proteólise contribuem assim para o amaciamento da pasta neste tipo de queijos.

Outra forma do lactato ser metabolizado é anaerobicamente, pela acção da bactéria *Clostridium tyrobutyricum*. Esta bactéria utiliza o lactato como substrato formando CO₂ e H₂. A produção de gás durante o período de maturação do queijo pode ser desejável no caso dos queijos do tipo Suíço e pela acção de bactérias propiónicas, mas também pode dar origem a defeitos no queijo.

O metabolismo anaeróbio do lactato pode dar origem a um defeito conhecido como flato ou opado tardio, no qual a *Clostridium tyrobutyricum* transforma o lactato em butirato e H₂. Este defeito é caracterizado pela formação de olhos ou fendas de tipo lenticular e ocorre apenas em determinadas variedades, de cura longa, nomeadamente naquelas cuja salga foi efectuada em salmoura. No caso dos queijos do tipo Suíço, a produção de gás é desejável

para a formação dos olhos característicos deste tipo de queijo, e assim o metabolismo do lactato pode ocorrer neste tipo de queijos através da acção de bactérias propiónicas.

A *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* metaboliza o lactato a propionato, acetato, CO₂ e H₂O (Piveteau, 1999). Mas a produção de propionato e acetato pode ser mais demorada se o número de *lactobacilli* “starter” for maior, o que inibe o crescimento das bactérias propiónicas.

2.2. Cromatografia HPLC

A cromatografia é uma técnica de separação dos componentes de uma determinada amostra. A separação é efectuada de acordo com as velocidades a que os componentes são transportados por uma fase móvel através de uma fase estacionária que se encontra fixa na coluna.

A técnica HPLC é uma cromatografia líquida utilizada para separar compostos que se encontram em solução. A fase estacionária requer partículas de pequenas dimensões e uma pressão elevada para que a fase móvel seja forçada a atravessar a coluna.

A cromatografia HPLC tem como principais vantagens, em relação à cromatografia líquida clássica, a rapidez e separações bem definidas.

Os principais componentes de um sistema HPLC são a bomba, o injector, a coluna, o detector e o registador/integrador. A bomba é responsável pela introdução da fase móvel no sistema de acordo com o fluxo que foi pré-estabelecido permitindo uma eluição isocrática ou por gradiente. Se a composição do eluente é fixa, estamos perante uma eluição isocrática, no caso de ser variável designa-se de eluição por gradiente

O injector carrega a amostra através de uma micro-seringa e efectua a sua introdução no sistema através da fase móvel que é continuamente introduzida na coluna. A quantidade de amostra introduzida é definida previamente no sistema, permitindo diversos volumes de injeção. A coluna também é definida previamente consoante os compostos a separar, sendo esta separação feita com base na afinidade nos compostos para as fases móvel e estacionária, tendo cada composto o seu tempo de retenção na coluna. O tempo de retenção define-se como o tempo que um determinado composto demora desde o injector até ao detector. A fase estacionária está fixa na coluna. O detector permite a transformação da concentração dos compostos em sinais eléctricos.

O registador regista o sinal recebido pelo detector e transforma-o num cromatograma, enquanto o integrador integra a área ou a altura dos picos. Desta forma, é possível efectuar a identificação e quantificação dos picos que figuram no cromatograma.

Na Figura 2 encontra-se representado um esquema de um sistema cromatográfico por HPLC.

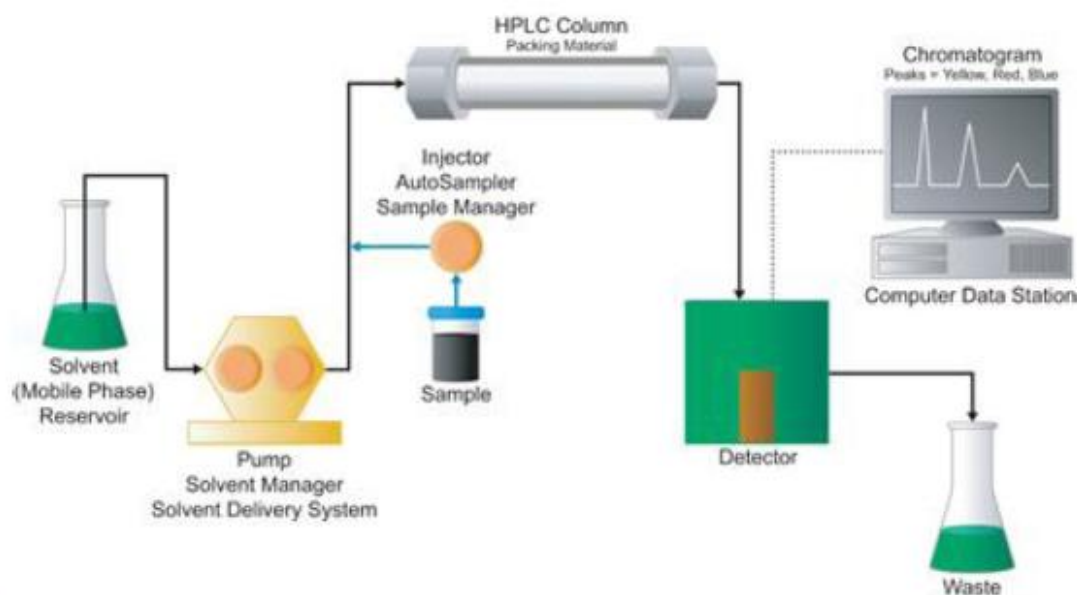


Figura 2 - Esquema de um sistema cromatográfico por HPLC

(retirado de apresentação UITA, 2011)

2.2.1. Determinação de ácidos orgânicos em queijo e algumas aplicações ao estudo do queijo

Os ácidos orgânicos contribuem para o sabor e aroma da maioria das variedades de queijos (Fox *et al.*, 2004). Como tal será interessante uma determinação quantitativa destes compostos não só para estudos sobre as características do queijo, mas também como indicador da actividade microbiana, visto estes compostos surgirem principalmente através da acção de diferentes microrganismos.

Nos últimos anos têm sido realizados e publicados estudos que abrangem a aplicação de HPLC no campo de análises alimentares (Matissek e Wittkowski, 1993). Alguns autores já reportaram tentativas de uso de perfis de HPLC para a detecção e quantificação de ácidos orgânicos em queijo. A maioria dos métodos de HPLC utilizados para a determinação de ácidos orgânicos em leite ou seus derivados é baseada na separação em colunas de

exclusão iónica em condições isocráticas e a detecção é normalmente efectuada a um comprimento de onda baixo, 210 a 220 nm (Matissek e Wittkowski, 1993).

Lues (2000) utilizou o método de Bouzas *et al.* (1991, 1993) com pequenas alterações para extrair açúcares e ácidos orgânicos de queijo. Para tal adicionou 25 mL de solução de H_2SO_4 0,009 N a 5 g de queijo Cheddar sul-africano previamente moído. Em seguida, efectuou uma agitação com agitador magnético durante 1 hora e posteriormente foi feita uma centrifugação durante 5 minutos. Foi então efectuada uma filtração com seringa da fase aquosa utilizando-se um filtro de 0,2 μm e procedeu-se à análise cromatográfica em HPLC sob as seguintes condições:

- Coluna Supelcogel C-610H troca iónica
- Fluxo: 1 mL/min
- Volume injeção: 40 μL
- Tempo de corrida: 40 min/injeção

Os valores mínimos e máximos variaram bastante entre os diferentes ácidos orgânicos, conforme se pode ver no Quadro I.

Quadro I - Valores mínimos e máximos de diferentes ácidos orgânicos em queijo Cheddar sul-africano

Ácido orgânico	Mínimo (mg kg^{-1})	Máximo (mg kg^{-1})
Acético	92	121
Butírico	111	504
Láctico	25933	27823
Oxálico	1418	1535
Propiónico	308	1109

Com o objectivo de avaliar a variação do teor em ácidos orgânicos durante a maturação de queijo conservado em salmoura ("*pickled white cheese*"), Akalin *et al.* (2002) adicionaram 40 mL de solução 0,5% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,038 M) – 0,4% (v/v) de acetonitrilo (0,049 M) a 7 g de amostra triturada, tendo o pH sido ajustado a 2,24 com H_3PO_4 . Foi efectuada uma extracção durante 1h, seguida de uma agitação e centrifugação durante 5 minutos. O sobrenadante foi posteriormente filtrado uma vez através de papel de filtro e duas vezes através de seringa com filtro de 0.45 μm . A análise em HPLC foi efectuada sob as seguintes condições:

- Coluna Machery Nagel, Düren, Germany
- Fluxo: 0,3 mL/min

- Volume injeção: 20 µL

As concentrações de ácido propiónico e butírico aumentaram ao longo da maturação, embora a taxas diferentes. O ácido acético começou a ser produzido no segundo mês, a partir do qual apresentou evoluções irregulares.

Para determinar quais os ácidos orgânicos que poderiam ser utilizados como preditores do tempo de maturação, foi efectuada uma análise de regressão linear múltipla, utilizando o programa SPSS. Seis funções discriminantes explicaram a variância total entre variáveis discriminantes. A maioria da variância foi explicada pelas três primeiras funções e a primeira função discriminante explicou 56% da variância. No total, foram discriminados pela análise 7 grupos de queijos, em função do tempo de maturação, os quais poderiam ser agrupados em 5 sub-grupos, como indicado no Quadro II.

Quadro II - Tempo de cura e evolução das concentrações de ácidos orgânicos no “*pickled white cheese*”

Tempo de cura do queijo	Aumento das concentrações	Diminuição das concentrações
	Ácidos propiónico, butírico e fórmico.	Ácidos pirúvico, láctico e cítrico;
0 - 1 mês		
	Ácidos pirúvico, láctico, cítrico, propiónico e butírico.	Ácidos acético, fórmico, orótico e úrico;
2 - 3 meses		
	Concentrações elevadas:	Concentrações baixas:
6 meses	Ácidos láctico, propiónico, butírico, fórmico, acético, orótico;	Ácido cítrico
9 meses	Ácidos láctico, butírico e propiónico.	-
12 meses	Ácidos butírico, propiónico e láctico.	-

Adaptado de Akalin *et al.* (2002)

Akalin *et al.* (2002) chegaram à conclusão que as concentrações dos ácidos butírico, propiónico, orótico e fórmico, seriam preditores significativos do tempo de maturação através da análise de regressão “passo a passo” (“*stepwise regression analysis*”).

Tavaria *et al.* (2004) estudaram os ácidos gordos livres voláteis como indicadores de maturação para o queijo Serra da Estrela e chegaram à conclusão que as concentrações dos ácidos acético, isobutírico e isovalérico, aumentavam até ao 90º dia de cura, mantendo-se constantes depois disso. Os resultados obtidos mostraram, assim, que estes compostos poderiam ser utilizados como indicadores de maturação para este tipo de queijo.

Demarigny *et al.* (1997) estudaram a influência da microflora presente no leite cru nas características do queijo do tipo Suíço e concluíram que durante a cura as concentrações de ácido acético e propiónico aumentaram em resultado do consumo de D- e L-lactato. A partir deste estudo, concluíram ainda que a microflora presente no leite tem uma influência significativa nas características bioquímicas e sensoriais dos queijos feitos a partir de leite cru. Também a origem da microflora possui uma influência não negligenciável nas características finais deste tipo de queijo, havendo provavelmente uma especificidade da flora de acordo com a origem do leite.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

Para a determinação do teor em ácidos orgânicos foram utilizados diferentes tipos de queijo, de diferentes origens, disponíveis no laboratório em resultado de vários trabalhos em curso. Os queijos provenientes dos Açores por via de um protocolo de colaboração para o estudo e melhoramento da qualidade dos mesmos, englobaram três tipos de queijo:

- Um queijo da ilha do Faial, queijo Ilha Azul (3 fabricos), e um queijo da ilha do Pico, queijo Moledo (3 fabricos), fabricados a partir de leite de vaca pasteurizado, destinados a curas por períodos diferentes (5 semanas e 3 semanas, respectivamente), período ao fim do qual os queijos prosseguiram para ensaios de conservação (4°C), estudo contemplado no protocolo existente; nestes dois casos foi possível dispor de queijo em cura e, em alguns casos, em conservação durante os períodos referidos, com análise efectuada ao longo da maturação e da conservação;
- Um queijo da ilha das Flores, de tipo Ilha (1 fabrico), fabricado a partir de leite pasteurizado, em que foi possível o acompanhamento das características ao longo da maturação;
- Dois queijos provenientes da Ilha de São Jorge (2 fabricos), das queijarias do Topo e da Uniqueijo, correspondentes à tipologia do queijo de São Jorge DOP, fabricados a partir de leite de vaca cru, para os quais foi também possível acompanhar a evolução ao longo da maturação.

Foram incluídas ainda, como elementos de diversificação em termos de características do queijo, algumas amostras correspondentes à tipologia do queijo de Azeitão DOP (4 amostras) e do queijo Serra da Estrela DOP (2 amostras), ambos fabricados a partir de leite cru de ovelha, provenientes das regiões de origem e sujeitas a avaliação sensorial nos laboratórios da UTA, no âmbito de um trabalho em curso, de colaboração com as empresas SATIVA e Beira e Tradição, Organismos Privados de Controlo designados para as referidas Denominações de Origem Protegidas.

Para a análise da evolução dos ácidos orgânicos ao longo da maturação foram apenas utilizados os queijos dos Açores. Estas amostras foram codificadas de acordo com o tipo de queijo e o tempo de maturação.

Nos quadros III a VII apresentam-se os códigos atribuídos às diferentes amostras e os respectivos tempos de maturação.

Quadro III - Codificação das amostras de queijo Moledo

Data de fabrico	Tempo de maturação (semanas)			
	1	3	5	11
13/01/2011	MA1s	MA3s	MA5s	MA11s
14/03/2011	MB1s	MB3s	MB5s	
27/04/2011	MC1s	MC3s	MC5s	

Quadro IV - Codificação das amostras de queijo Ilha Azul

Data de fabrico	Tempo de maturação (semanas)					
	1	3	5	7	13	19
24/03/2011	IAA1s	IAA3s	IAA5s	IAA7s	IAA13s	IAA19s
27/04/2011	IAB1s	IAB3s	IAB5s	IAB7s	IAB13s	IAB19s
16/06/2011	IAC1s	IAC3s	IAC5s	IAC7s	IAC13s	IAC19s

Quadro V - Codificação das amostras de queijo Topo (São Jorge)

Data de fabrico	Tempo de maturação (dias)					
	15	30	45	60	90	120
01/02/2012	SJT15	SJT30	SJT45	SJT60	SJT90	SJT120

Quadro VI - Codificação das amostras de queijo Uniqueijo (São Jorge)

Data de fabrico	Tempo de maturação (dias)					
	15	30	45	60	90	120
01/02/2012	SJU15	SJU30	SJU45	SJU60	SJU90	SJU120

Quadro VII - Codificação das amostras de queijo das Flores (tipo Ilha)

Data de fabrico	Tempo de maturação (dias)		
	30	90	120
01/02/2012	IF30	IF90	IF120

Os queijos foram recepcionados no Laboratório das Indústrias Lácteas da Unidade de Investigação de Tecnologia Alimentar (UITA) do INRB, onde também decorreu o trabalho experimental. O armazenamento das amostras até ao momento da análise foi efectuado em arca frigorífica, à temperatura de -24 °C.

3.2. Análises gerais aos queijos

Este estudo é uma parte de um projecto mais amplo de caracterização de queijos provenientes dos Açores. Nesse âmbito, as amostras foram submetidas a diversas análises de forma a uma caracterização mais completa. Os resultados não farão parte da discussão, a qual se limitará ao objectivo central deste estudo, mas os parâmetros de caracterização avaliados previamente nas diferentes amostras e os respectivos métodos de análise utilizados são descritos sucintamente em seguida.

- Resíduo seco

Para a determinação do resíduo seco foi utilizado o método ISO 5534/IDF 4, no qual o princípio é a pesagem da amostra, seguida de uma secagem em estufa a 102 °C e nova pesagem, até peso constante.

- Gordura

A norma utilizada para a determinação do teor em gordura foi a NP 2105, sendo seguido o método Van Gulik, que consiste na separação da matéria gorda da amostra por

centrifugação no butirómetro Van Gulik, após a digestão das proteínas pelo ácido sulfúrico. A adição de álcool isoamílico facilita a separação da gordura.

- Proteína bruta

A determinação de proteína bruta foi efectuada de forma indirecta através da determinação do teor em azoto total presente na amostra pelo método de Kjeldahl. Numa primeira etapa ocorre a mineralização completa do azoto orgânico e, em seguida, efectua-se uma destilação do NH_4^+ resultante da mineralização, seguida de uma titulação com HCl.

- Lactose

Para determinar o teor em lactose foi utilizado um método desenvolvido no laboratório, que se baseia numa análise por HPLC com um detector de índice de refração.

- Cinza

O método de análise utilizado para a determinação da cinza foi o descrito na norma IDF 27, sendo efectuada uma incineração da amostra em mufla após pesagem prévia. Após arrefecimento a amostra foi novamente pesada.

- Cloretos

A norma seguida foi a ISO 5943/IDF 88. Efectuou-se uma homogeneização da suspensão da amostra em água acidificada com ácido nítrico e, em seguida, uma titulação potenciométrica com uma solução de nitrato de prata padronizada.

- Fracções azotadas

Para as determinações dos teores de azoto solúvel em água, azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCA), 12% de concentração final, e azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTA), 5% (concentração final), foi seguida a metodologia de Kuchroo e Fox (1985), no qual os princípios do método são o fraccionamento químico e o doseamento pelo método de Kjeldahl.

- pH

Uma amostra de queijo foi dispersa em água destilada e a leitura do pH feita em potenciómetro, sendo o resultado expresso em unidades de pH à temperatura de 20 °C (AFNOR, 1983, Chimie VII-9).

- Acidez

O método utilizado para determinar a acidez do queijo foi o descrito pela AOAC-1984 que se baseia numa titulação com NaOH 0,1 N. A amostra de queijo foi dissolvida em água destilada a 40 °C e em seguida filtrada. Retirou-se 25 mL de soluto e titulou-se com NaOH 0,1 N na presença de fenolftaleína, com os resultados a serem expressos em ácido láctico.

- Acidez na gordura

Para determinar a acidez na gordura foi seguida a norma ISO 1740/IDF 6, cujo fundamento é uma titulação da matéria gorda extraída com hidróxido tetra-butilamónio.

- Coeficiente de maturação

Este coeficiente é um indicador de proteólise e calcula-se através da seguinte fórmula:

$$\frac{AS}{AT} \times 100$$

onde,

AS –azoto solúvel em água

AT – azoto total

- Cálcio

O cálcio foi determinado por espectrofotometria de absorção atómica (ISO 8070/IDF 119).

3.3. Desenvolvimento e validação da metodologia para determinação de ácidos orgânicos em queijo por HPLC

Para o desenvolvimento da metodologia analítica tomou-se como ponto de partida a existência na UTA de uma coluna de HPLC, específica para a separação de ácidos orgânicos. A escolha inicial das condições cromatográficas a adoptar foi assim baseada nas especificações do fabricante da coluna (Aquasil C18 da Thermo).

3.3.1. Ensaios preliminares para selecção da fase móvel e do solvente de extracção

No início do estudo foram testadas, como fase móvel, uma solução de KH_2PO_4 0,05M, a $\text{pH}=2,8$, e outra solução equivalente mas à qual se adicionou acetonitrilo numa proporção de

99% de KH_2PO_4 para 1% de acetonitrilo, tal como estava descrito na especificação da coluna. Acabou por se optar pela segunda opção por ser a aconselhada pelo fabricante da coluna utilizada.

Definiu-se como quantidade de amostra a analisar 2g de queijo, para um volume de solvente de extracção de 50 mL. A escolha destas condições foi baseada na preparação e na análise cromatográfica experimental de várias amostras de diferentes tipos de queijo, para os quais se obtiveram os cromatogramas com uma linha de base direita e com pouco ruído, assim como picos bem definidos e com uma altura e área razoáveis.

Com o objectivo de definir o método, de extracção dos ácidos orgânicos das amostras de queijo, foram ainda testados três diferentes métodos, utilizando os seguintes solventes de extracção:

- Água;
- KH_2PO_4 0,05M com pH=2,0;
- KH_2PO_4 0,05M com pH=2,8.

O KH_2PO_4 0,05M a pH=2,8 foi testado por ser um dos constituintes da fase móvel utilizada. O KH_2PO_4 0,05M com pH=2,0 foi testado, pois a bibliografia refere um método de extracção com solvente aquoso de pH 2,0 (Lues et al, 1999)

Para cada solvente de extracção, foram efectuadas 8 repetições independentes sobre uma mesma amostra – MC5s. A amostra foi escolhida tendo em conta que as diversas amostras já se encontravam no laboratório e aquela que existia em maior quantidade era a MC5s semanas, o que permitiu efectuar as várias metodologias e repetições sem qualquer constrangimento por falta de amostra.

Após as determinações analíticas, efectuou-se uma análise estatística às áreas obtidas para os ácidos láctico (pico maioritário das amostras) e oxálico com base no Teste t de Student, para comparação de médias (software Excel). Os resultados obtidos neste teste e a análise visual dos cromatogramas indicaram que o KH_2PO_4 pH=2,8 seria o melhor método de extracção (ver ponto 4.1.).

3.3.2. Procedimentos adoptados

Definidas as condições cromatográficas, a quantidade de amostra a analisar e o método de extracção, procedeu-se à preparação de soluções-mãe de diferentes ácidos orgânicos com

o objectivo de criar uma biblioteca no programa Millenium, utilizado para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos nas amostras.

Os cinco ácidos orgânicos, escolhidos com base na sua importância na maturação e na quantidade obtida nos ensaios prévios, foram os ácidos oxálico, láctico, acético, propiónico e butírico.

Com vista à validação do método, foi efectuada uma série de parâmetros de avaliação indirecta. Para verificar a linearidade recorreu-se a rectas de calibração para cada ácido orgânico enquanto os cálculos dos Limites de Detecção e de Quantificação permitiram determinar o limite a partir do qual é possível detectar e quantificar o analito. A repetibilidade foi utilizada com o objectivo de avaliar a precisão do método. Estes parâmetros de validação da metodologia são descritos mais pormenorizadamente no ponto 4.1..

Seguidamente serão descritas as condições cromatográficas.

3.3.3. Condições cromatográficas

O equipamento de HPLC utilizado foi da marca Waters, modelo Alliance o qual é composto por um sistema de bombas de gradientes, um injector automático e um detector de fotodíodos. A coluna utilizada foi o modelo Aquasil C18 da Thermo, que foi concebido para a separação de moléculas polares por fase inversa.

No Quadro VIII estão definidas algumas das características da coluna.

Quadro VIII - Características da coluna utilizada no trabalho experimental

Descrição	Tamanho das partículas (µm)	Dimensões (mm)
AQUASIL C18	5	250 x 4.6

As condições cromatográficas definidas para a determinação de ácidos orgânicos em queijo foram as seguintes:

- Fluxo: 0,7 mL/min
- Número de injeções: 1
- Volume de injeção: 50 µL
- Tempo de corrida: 40 minutos
- Detecção por UV no comprimento de onda de 210 nm
- Temperatura: ambiente

O tempo de corrida para cada amostra foi de 40 minutos, pois sabendo os tempos de retenção de cada ácido orgânico isoladamente, um tempo de corrida de 40 minutos é suficiente para separar, detectar, identificar e quantificar os ácidos orgânicos em estudo, havendo uma margem caso haja alguma variação na pressão ou no pH da fase móvel ou da solução de extracção.

3.3.4. Preparação da fase móvel para a determinação de ácidos orgânicos presentes em queijo por HPLC

Numa balança METTLER PJ3600 DeltaRange pesaram-se 6,8 g de KH_2PO_4 99,5% (Scharlau) para um copo volumétrico e adicionou-se água até aos 800 mL. Acertou-se o pH com ácido fosfórico 85% (MERCK) até atingir 2,8. Transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água. Adicionou-se 10,1 mL de acetonitrilo 99,9% (SDS), agitou-se e efectuou-se uma filtração a vácuo, com filtro 0.45 μm .

3.3.5. Preparação das soluções-mãe e dos padrões de ácidos orgânicos

Reagentes:

- Ácido oxálico 99,5% – 102,5% (Alfa Aesar)
- Ácido láctico 88% – 92% (Riedel –de Haën)
- Ácido acético glacial 100% (PRONALAB)
- Ácido propiónico >99% (MERCK – Schuchardt)
- Ácido butírico >99% (MERCK – Schuchardt)

Uma vez que a resposta dada pelo detector (absorvâncias) para cada ácido orgânico é diferente para concentrações idênticas, a gama de trabalho (zona de concentrações de padrões a utilizar na recta de calibração) escolhida para cada um dos ácidos não pode ser a mesma. A preparação das soluções-mãe dos ácidos orgânicos e seguidamente dos diversos padrões (6) foi efectuada seguindo um esquema pré-definido (ver em Anexo).

Para a preparação das soluções-mãe pesaram-se numa balança AG204 os diversos ácidos orgânicos para os respectivos balões volumétricos e o volume restante foi completado com KH_2PO_4 cujo pH terá sido acertado previamente a 2,8. Em seguida foi efectuada uma ligeira agitação. Os padrões mistos foram preparados adicionando-se volumes pré-definidos dos cinco ácidos orgânicos para cada balão consoante o padrão em preparação.

3.3.6. Preparação do solvente de extracção

Pesaram-se para uma balança METTLER PJ2600 DeltaRange 6,8 g de KH_2PO_4 99,5% (Scharlau) para um copo volumétrico e adicionou-se água até aos 800 mL. Acertou-se o pH com ácido fosfórico 85% (MERCK) até atingir 2,8. Transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água.

3.3.7. Preparação das amostras de queijo para determinação de ácidos orgânicos por HPLC

O queijo foi devidamente preparado, tendo sido retirada a casca e o queijo cortado em pedaços. Foi efectuada uma homogeneização no homogeneizador Grindomix (Retsch, GM200) e a amostra foi devidamente acondicionada e identificada em frasco de plástico.

Numa balança AG204 pesou-se 2 g de amostra para um tubo de centrífuga (Mistral), adicionou-se 50 mL de solução de KH_2PO_4 pH 2.8 e homogeneizou-se no Polytron durante aproximadamente 1 minuto. Em seguida a amostra foi sujeita a uma centrifugação durante 20 minutos, a uma temperatura de 5 °C e à velocidade de 3500 rpm. Após a centrifugação foi efectuada uma filtração com membrana de seringa de 0,45 µm e em seguida a amostra foi colocada em HPLC para detecção, identificação e quantificação de ácidos orgânicos.

3.4. Análise de resultados

Para uma melhor visualização da evolução dos ácidos orgânicos ao longo da maturação recorreu-se à realização de gráficos através de ferramenta própria constante das folhas de cálculo informático da Microsoft Excel (versão 2003-2007, Microsoft), utilizando-se, na maior parte dos casos, as médias dos valores encontrados para cada tipo de queijo e idêntico tempo de maturação. Todas as determinações foram efectuadas em duplicado.

Para a avaliação comparativa dos resultados referentes ao perfil de ácidos orgânicos em função do tipo de queijo, foi utilizada a análise de componentes principais (ACP), um método estatístico muito utilizado na análise de dados multivariados. A ACP permite transformar um conjunto de variáveis originais intercorrelacionadas num novo conjunto de variáveis não correlacionadas que se designam por componentes principais. Um dos objectivos principais é apurar se existe um número pequeno das primeiras componentes principais que seja responsável por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original e, desta forma, reduzir os dados para uma melhor visualização e compreensão dos mesmos.

Foi ainda utilizado outro método de estatística multivariada, a classificação hierárquica (CH) ou análise de “clusters”, para observar, de acordo com outra metodologia, o modo como as diferentes amostras se poderiam agregar em classes pela semelhança do perfil de ácidos orgânicos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Optimização da metodologia de determinação dos ácidos orgânicos em queijo

A validação do método de análise utilizado no trabalho experimental foi realizada com base em diversos parâmetros de avaliação e surge da necessidade de implementação de um método analítico por HPLC adequado à detecção e quantificação de ácidos orgânicos em queijo.

Para validar um método interno de ensaio em análise química é necessário demonstrar a sua credibilidade e evidenciar que o método adoptado possui as características essenciais para a aquisição de resultados com a qualidade exigida (Guia RELACRE 13).

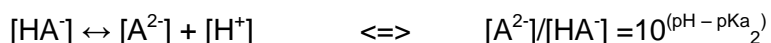
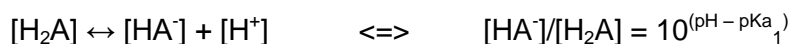
Os requisitos mínimos para a validação de um método interno de ensaio incluem o estudo dos seguintes parâmetros:

- Avaliação do melhor solvente de extracção
- Gama de trabalho
- Linearidade
- Limiares Analíticos do Método de Ensaio
 - ✓ Limite de Detecção
 - ✓ Limite de Quantificação
- Sensibilidade
- Precisão
- Exactidão

Avaliação do melhor método de extracção

Tal como referido anteriormente foram testados três solventes com o objectivo de avaliar o melhor método de extracção dos ácidos orgânicos. De notar que para o solvente de extracção a pH=2,0 se observou um desdobramento do ácido oxálico em dois picos, o que não aconteceu para o método de extracção com KH_2PO_4 a pH=2,8 ou com H_2O . Verificou-se inclusive que a área do pico obtido com KH_2PO_4 a pH=2,8 equivalia sensivelmente à área obtida somando os dois picos que aparecem com KH_2PO_4 a pH=2,0.

Os cálculos apresentados de seguida confirmam o referido anteriormente.



Para o ácido oxálico:

$$K_1 = 6,5 \cdot 10^{-2} ; \text{pK}_{\text{a}_1} = 1,2$$

$$K_2 = 6,1 \cdot 10^{-5} ; \text{pK}_{\text{a}_2} = 4,2$$

Para um **pH = 2,8**:

$$[\text{HA}^-]/[\text{H}_2\text{A}] = 10^{(2,8-1,2)} \approx 40 \rightarrow \text{ácido oxálico encontra-se maioritariamente na forma de } [\text{HA}^-]$$

$$[\text{A}^{2-}]/[\text{HA}^-] = 10^{(2,8-4,2)} \approx 0,04 \rightarrow \text{ácido oxálico encontra-se maioritariamente na forma de } [\text{HA}^-]$$

A pH=2,8, as espécies $[\text{H}_2\text{A}]$ e $[\text{A}^{2-}]$ existem em quantidades desprezáveis face à espécie $[\text{HA}^-]$, justificando-se, assim, o aparecimento de apenas um pico no cromatograma.

Para um **pH = 2,0**:

$$[\text{HA}^-]/[\text{H}_2\text{A}] = 10^{(2,0-1,2)} \approx 6 \rightarrow \text{a forma } [\text{HA}^-] \text{ é seis vezes superior a } [\text{H}_2\text{A}], \text{ mas ambas coexistem}$$

$$[\text{A}^{2-}]/[\text{HA}^-] = 10^{(2,0-4,2)} \approx 0,006 \rightarrow \text{a forma } [\text{A}^{2-}] \text{ praticamente não existe}$$

A pH=2,0, existem ambas as espécies $[\text{HA}^-]$ e $[\text{H}_2\text{A}]$, sendo $[\text{HA}^-] \approx 6[\text{H}_2\text{A}]$, justificando-se, assim, a existência de dois picos, um maior correspondente a HA^- e coincidente com o pico obtido a pH=2,8 e um menor correspondente a H_2A .

Esta observação invalidou logo à partida a utilização de KH_2PO_4 a pH=2,0 como solvente de extracção.

No trabalho experimental realizado foram utilizados como referência oito pontos de calibração e para averiguar a existência de diferenças significativas entre as variâncias recorreu-se ao Teste t-Student através de uma ferramenta própria presente nas folhas de cálculo informático Microsoft Excel (versão 2003, Microsoft).

O teste de homogeneidade de variâncias foi efectuado para dois dos ácidos orgânicos em estudo, o ácido láctico por ser o maioritário e o ácido oxálico por ser aquele cujo pico é o

primeiro a ser identificado. Como foram testados três métodos de extracção procurou-se averiguar a existência de diferenças significativas entre as variâncias dos três métodos. Efectuou-se o Teste F para verificar a homogeneidade de variâncias e, deste modo, optar pelo teste Teste t-Student mais adequado. Os resultados obtidos encontram-se nos Quadros IX, X e XI.

Quadro IX - Médias das áreas de ácido láctico e de ácido oxálico utilizadas para o Teste t-Student

Diferenças significativas	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.8	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	KH ₂ PO ₄ pH=2.8
Ácido láctico	2742294	2754248	2742294	2779449	2754248	2779449
Ácido oxálico	961003	475984	961003	860432	475984	860432

Quadro X - Teste de homogeneidade de variâncias entre os três métodos de extracção em estudo

Homogeneidade de variâncias	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.8	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	KH ₂ PO ₄ pH=2.8
Ácido láctico	Não		Sim		Sim	
Ácido oxálico	Sim		Não		Não	

Após a realização do Teste F, procedeu-se ao estudo das diferenças significativas entre os três métodos de extracção através do Teste t-Student (Quadro XI).

Quadro XI - Diferenças significativas entre os três métodos de extracção em estudo

Diferenças significativas	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	H ₂ O	KH ₂ PO ₄ pH=2.8	KH ₂ PO ₄ pH=2.0	KH ₂ PO ₄ pH=2.8
Ácido láctico	Não		Não		Não	
Ácido oxálico	Sim		Não		Sim	

Ao analisarmos os Quadros IX e XI verificamos que se notam diferenças mais significativas para o ácido oxálico. Para este ácido orgânico verifica-se que a água o extrai melhor do que o KH₂PO₄ pH=2,0. O KH₂PO₄ pH=2,8 também parece extrair melhor este ácido do que o KH₂PO₄ pH=2,0. Como tal excluiu-se este último.

Comparando a água com KH₂PO₄ pH=2,8 observou-se uma maior área na extracção com água. No entanto, após uma análise visual dos cromatogramas obtidos, nomeadamente à forma do pico e à sua base, concluiu-se que na extracção efectuada com a água a separação de alguns compostos não era efectuada, daí a obtenção de um pico com área

maior. Optou-se, assim, pelo uso do KH_2PO_4 pH=2,8 como método de extracção dos ácidos orgânicos.

Gama de trabalho

Para modelos lineares, como é o caso, o Guia RELACRE 13 recomenda o uso da norma ISO 8466-1. Esta norma aconselha dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco e a sua distribuição deve ser feita de forma igual na gama de concentrações. Optou-se por considerar 6 pontos de calibração para as rectas.

No Quadro XII encontram-se as gamas de trabalho obtidas para os cinco ácidos orgânicos em estudo.

Quadro XII - Gama de trabalho para os ácidos orgânicos em estudo

Ácido orgânico	Concentração mínima ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração máxima ($\mu\text{g/mL}$)
Acético	100	3005
Butírico	101	3037
Láctico	101	3030
Oxálico	5	150
Propiónico	105	3147

Linearidade

Para avaliar a linearidade recorreu-se a uma inspecção visual das curvas de calibração, ao cálculo e análise do coeficiente de determinação e à análise de resíduos. A inspecção visual das curvas de calibração não indicou nenhum desvio à linearidade. Ao observar os valores dos coeficientes de determinação obtidos verificou-se que estes foram sempre superiores a 0,99 o que indica uma boa linearidade, visto o valor máximo possível ser 1.

Os coeficientes de determinação obtidos encontram-se no Quadro XIII e uma análise feita aos resíduos também não indicou nenhuma violação à hipótese de linearidade, visto os resíduos se dispersarem aproximadamente numa banda horizontal em torno do zero, como se pode ver na Figura 3.

Quadro XIII - Valores dos coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração dos ácidos orgânicos

Ácido orgânico	Coeficiente de determinação (R^2)
Acético	0,998034
Butírico	0,995896
Láctico	0,998362
Oxálico	0,998905
Propiónico	0,998636

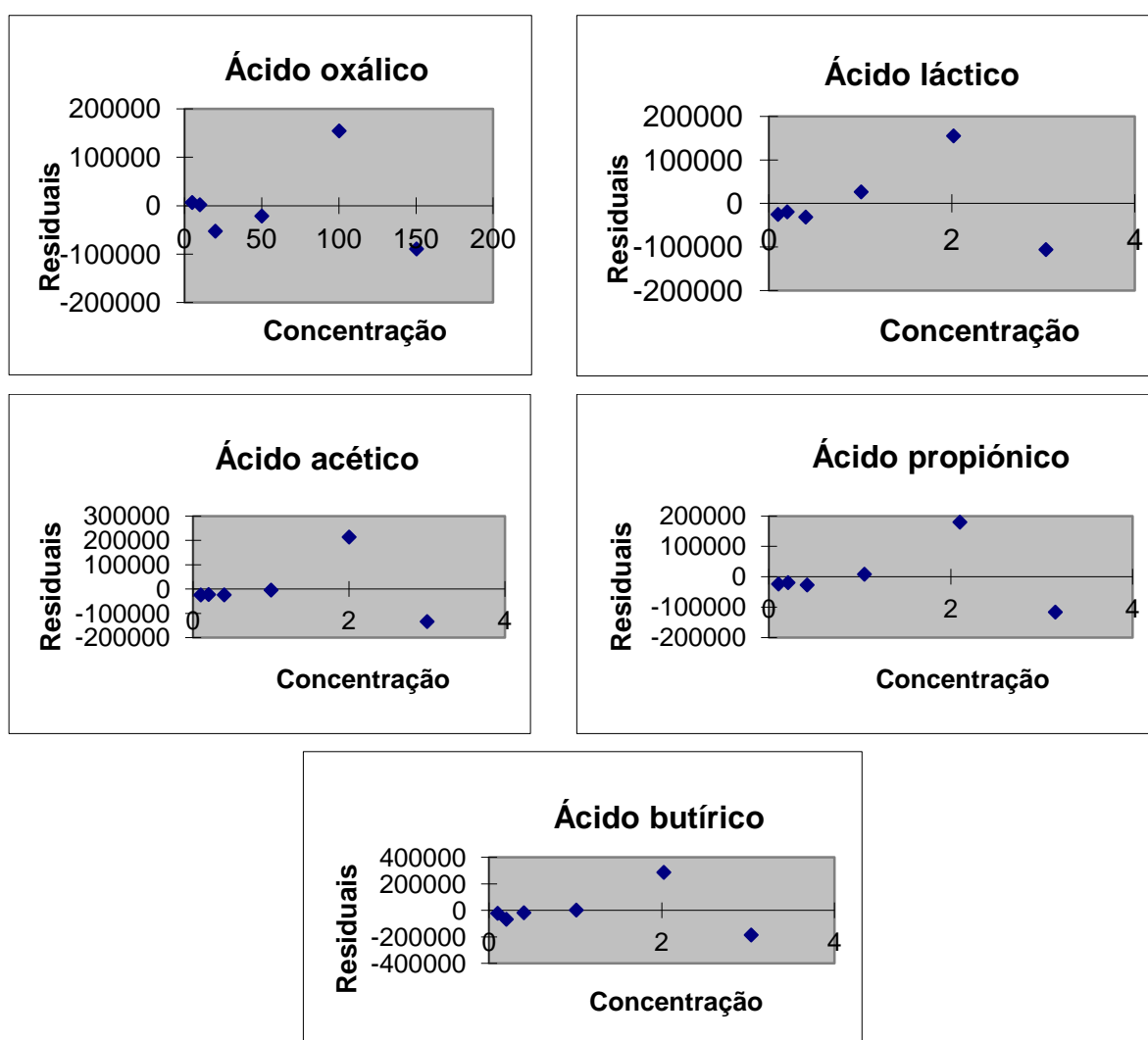


Figura 3 – Gráficos dos resíduos dos ácidos orgânicos estudados

Limites Analíticos do Método de Ensaio

1. Limite de Detecção

É definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável.

Se for efectuada uma leitura inferior ao limite de detecção isso não significa que o analito se encontra ausente, significa apenas que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em estudo será inferior a um determinado valor.

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$LD = (3,3 \cdot S_{y/x})/b$$

Onde:

$S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração

b – declive da curva de calibração

O cálculo do limite de detecção foi efectuada para cada ácido orgânico em estudo e os valores obtidos encontram-se no Quadro XIV.

Quadro XIV - Limites de detecção obtidos para cada ácido orgânico em estudo

Ácido Acético (mg/mL)	Ácido Butírico (mg/mL)	Ácido Láctico (mg/mL)	Ácido Oxálico (µg/mL)	Ácido Propiónico (mg/mL)
0,2	0,3	0,2	7	0,2

2. Limite de Quantificação

Corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão.

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$LQ = (10 \cdot S_{y/x})/b$$

Onde:

$S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração

b – declive da curva de calibração

Tal como para o limite de detecção, também foi efectuado o cálculo do limite de quantificação para cada ácido orgânico em estudo. Os valores obtidos encontram-se no Quadro XV.

Quadro XV - Limites de quantificação para cada ácido orgânico em estudo

Ácido Acético (mg/mL)	Ácido Butírico (mg/mL)	Ácido Láctico (mg/mL)	Ácido Oxálico (µg/mL)	Ácido Propiónico (mg/mL)
0,6	0,8	0,5	22	0,5

Sensibilidade

Este parâmetro avalia a capacidade do método para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Quando a curva de calibração é definida por um modelo linear, a sensibilidade é dada pelo valor do declive da recta de calibração. Desta forma, os valores dos declives obtidos foram os seguintes:

Quadro XVI - Valores dos declives (sensibilidade) obtidos para os cinco ácidos orgânicos em estudo

Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Láctico	Ácido Oxálico	Ácido Propiónico
$2,215333 \cdot 10^6$	$2,074632 \cdot 10^6$	$1,837543 \cdot 10^6$	$4,346360 \cdot 10^4$	$2,166469 \cdot 10^6$

Verificou-se, assim, que o método é um pouco menos sensível para o ácido oxálico, visto que o valor do declive da sua recta de calibração é bastante inferior às rectas dos restantes ácidos orgânicos.

Precisão

Tem como objectivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes. Esta avaliação pode ser feita com base na repetibilidade e na reprodutibilidade.

A repetibilidade exprime a precisão de um método efectuado em condições idênticas, ou seja, diz respeito a ensaios efectuados sobre a mesma amostra em condições o mais estáveis possível.

Para a determinação da repetibilidade do método de ensaio efectuaram-se 8 medições sobre a mesma amostra em condições análogas. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade é calculado através da seguinte fórmula:

$$r = 2,8 \times S_{ri}$$

Onde:

S_{ri} – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados

Os valores obtidos para cada ácido orgânico podem ser consultados no Quadro XVII.

Quadro XVII - Valores de repetibilidade (mg/100g) obtidos para os ácidos orgânicos em estudo

Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Láctico	Ácido Oxálico	Ácido Propiónico
20	163	194	4	38

Exactidão

Uma forma de avaliar a exactidão do método é através da realização de testes de recuperação. Estes testes consistem na adição de quantidades conhecidas do analito à amostra e têm como finalidade avaliar a fracção de analito que foi efectivamente detectada pelo método de ensaio.

O cálculo da percentagem de recuperação foi efectuado com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{recuperação} = 100 - \frac{\text{valorreal} - \text{valoradicinado}}{\text{valorreal}} \times 100\%$$

As percentagens de recuperação dos cinco ácidos orgânicos em estudo encontram-se no Quadro XVIII.

Quadro XVIII - Percentagens de recuperação dos ácidos orgânicos

Ácido orgânico	Recuperação (%)
Oxálico	89
Láctico	115
Acético	102
Propiónico	115
Butírico	107

Em cromatografia consideram-se como valores aceitáveis, percentagens que se encontrem sensivelmente entre os 80 e os 120%. Verifica-se, assim, que as percentagens de recuperação obtidas se encontram sensivelmente dentro dos valores aceitáveis.

4.2. Evolução de ácidos orgânicos em queijos dos Açores

O objectivo essencial deste trabalho foi o estudo e desenvolvimento de uma metodologia que permitisse avaliar o teor em ácidos orgânicos em queijo, de grande utilidade face ao impacto que os mesmos têm nas características sensoriais do queijo, designadamente nas propriedades olfacto-gustativas, embora não seja de desprezar a influência que os níveis de acidez podem ter nas propriedades físicas do produto.

Não obstante, e dado que a metodologia estudada foi testada e utilizada em estudos em curso na UTA, não deixaremos de tecer algumas considerações sobre os resultados apurados, as quais não pretendem mais do que identificar alguns aspectos e levantar algumas questões que, em conjunto com outros dados tecnológicos e analíticos disponíveis, podem ser mais pormenorizadamente estudadas pela instituição onde foi desenvolvido este trabalho.

O queijo Moledo, é um queijo fabricado a partir de leite de vaca pasteurizado, com adição de fermentos lácticos no processo de fabrico, e que pretende seguir uma tipologia correspondente a um queijo de pasta bastante mole, de cura curta (3 semanas).

Para qualquer um dos três fabricos de queijo Moledo (Fig.4), verifica-se um aumento da concentração de ácidos orgânicos ao longo do tempo de cura, podendo observar-se um aumento da concentração de ácidos orgânicos até à 5ª semana de maturação, havendo

posteriormente uma tendência para a estabilização, quando da colocação do queijo em condições de conservação (4°C).

Quer os níveis de ácidos orgânicos totais quer a sua evolução mostram alguma heterogeneidade nos resultados para as mesmas fases, o que demonstra alguma inconstância a nível das condições do fabrico, resultando provavelmente em alguma instabilidade físico-química que afecta a actividade microbiana. Os níveis iniciais variaram entre 3000 e 4000 mg/100g de queijo, tendendo para uma maior homogeneidade no final da maturação (5 semanas).

O queijo Ilha Azul é um queijo de tipo “prato”, fabricado a partir de leite pasteurizado, com adição de fermentos lácticos, destinado a uma maturação um pouco mais longa (5-7 semanas), de pasta bastante mais firme que o anterior.

Tal como para o queijo Moledo, a concentração de ácidos orgânicos também aumenta ao longo da maturação para os três fabricos de Ilha Azul. Mas, ao contrário do que acontece com o queijo Moledo, a concentração de ácidos orgânicos ao longo do tempo de maturação evolui de forma muito semelhante para os três fabricos.

Observa-se um aumento do teor de ácidos orgânicos ligeiramente acentuado até à 7ª semana, correspondendo às condições de maturação do queijo (12°C, 80%HR) e um aumento mais gradual entre a 7ª e a 13ª semana, correspondendo ao período de conservação. Ao compararmos o queijo Moledo com o queijo Ilha Azul pode verificar-se que este último revela uma menor concentração de ácidos orgânicos. Enquanto o Moledo com 1 semana de cura possui concentrações que variam entre as 3000 e as 4000 mg/100g, o queijo Ilha Azul apresenta teores mais baixos, a rondar as 2000 mg/100g.

E ao longo das semanas de maturação verifica-se que o aumento de ácidos orgânicos é mais pronunciado no queijo Moledo, atingindo valores de 5000 a 6000 mg/100g, enquanto o queijo Ilha Azul não vai além das 4500 mg/100g.

Não só o queijo Moledo apresenta um maior teor em ácidos orgânicos como atinge esses valores em apenas 5 a 11 semanas, enquanto o queijo Ilha Azul foi estudado até às 13 a 19 semanas de maturação e não chegou a atingir valores tão elevados. Estas diferenças explicam-se certamente pelos diferentes processos de fabrico, incluindo os diferentes tipos de fermentos lácticos utilizados em cada caso. Queijos de pasta mole, tendencialmente com maior teor de humidade, tendem a potenciar a actividade microbiana, conduzindo, normalmente, a maiores e mais rápidas produções de ácido láctico e, certamente, de outros ácidos orgânicos.

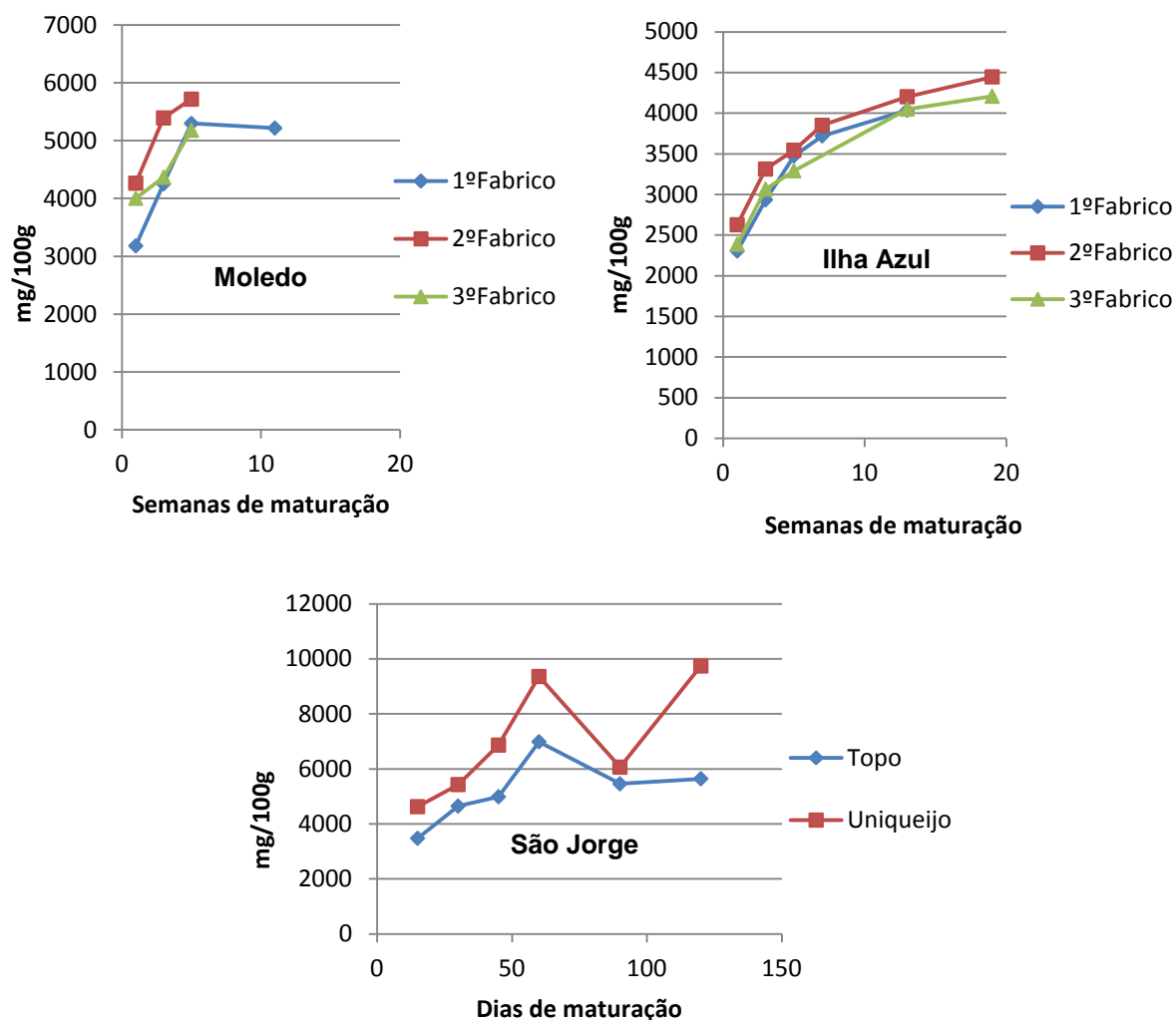


Figura 4 – Evolução do teor total em ácidos orgânicos nos queijos Moledo, Ilha Azul e São Jorge

Para queijos tecnologicamente de outro tipo, como são os queijos tipo Ilha ou o queijo São Jorge, os teores em ácidos orgânicos e, sobretudo, o tempo em que eles são atingidos são bastante diferentes. Estes tipos de queijo, resultam de fabricos mais elaborados, de tipo semelhante à tecnologia do queijo Cheddar, com um longo trabalho de coalhada ao longo do qual se processa uma boa parte da actividade das bactérias lácticas, quer adicionados sob a forma de fermentos industriais, quer sob a forma de soro de fabricos anteriores.

Como se pode observar na Figura 4, a concentração de ácidos orgânicos em queijo São Jorge aumenta até aos 60 dias de maturação. Após este período ocorre uma diminuição significativa até aos 90 dias de cura. Até este momento, a evolução parece semelhante entre o queijo das duas proveniências mas, para os 120 dias, a evolução é diferente, o que apontaria para a necessidade de se dispor de mais produtos para avaliação.

O queijo São Jorge apresenta uma concentração em ácidos orgânicos aos 15 dias de maturação semelhante à do queijo Moledo ao fim de 1 semana. Apesar de os tempos de maturação estudados não terem sido os mesmos para ambos os queijos e tendo em conta que 5 semanas equivalem a 35 dias e 11 semanas equivalem a 77 dias, pode-se observar que ao 35º dia ambos os queijos apresentavam concentrações de ácidos orgânicos semelhantes. No entanto, até ao 60º dia o queijo São Jorge apresenta um aumento do teor em ácidos orgânicos superior ao do queijo Moledo, e, se a comparação for feita entre o queijo São Jorge e o queijo Ilha Azul, as diferenças são claramente maiores, quer nas concentrações iniciais quer nas concentrações finais de ácidos orgânicos, dados que mostram, de facto, a influência das tecnologias de fabrico, correspondendo, necessariamente, à obtenção de queijos diferentes.

Mas se as diferenças relativamente aos teores totais em ácidos orgânicos são acentuadas, vale a pena considerar o perfil de presença dos diferentes componentes deste grupo, dos quais estudámos cinco.

Pela observação da Figura 5 podemos constatar que as concentrações de ácido oxálico obtidas em queijo Moledo encontram-se acima do limite de detecção.

Para o 1º Fabrico de queijo Moledo a concentração de ácido oxálico presente no queijo na 1ª semana encontra-se ligeiramente abaixo do limite de quantificação. No entanto, nas semanas seguintes, a concentração de ácido oxálico aumenta passando a situar-se acima do limite de quantificação.

Apesar de inicialmente o queijo Moledo 1º Fabrico ser aquele que apresenta menor teor em ácido oxálico, é, no entanto, aquele que apresenta uma subida mais acentuada de ácido oxálico nas três primeiras semanas. A partir da 3ª semana continua a aumentar, mas com tendência para estabilizar. No queijo Moledo 2º Fabrico ocorre um ligeiro aumento da concentração de ácido oxálico até às 5 semanas.

Quanto ao queijo Moledo 3º Fabrico o teor em ácido oxálico mantém-se relativamente estável até às 3 semanas, após as quais ocorre uma ligeira subida até à 5ª semana de cura.

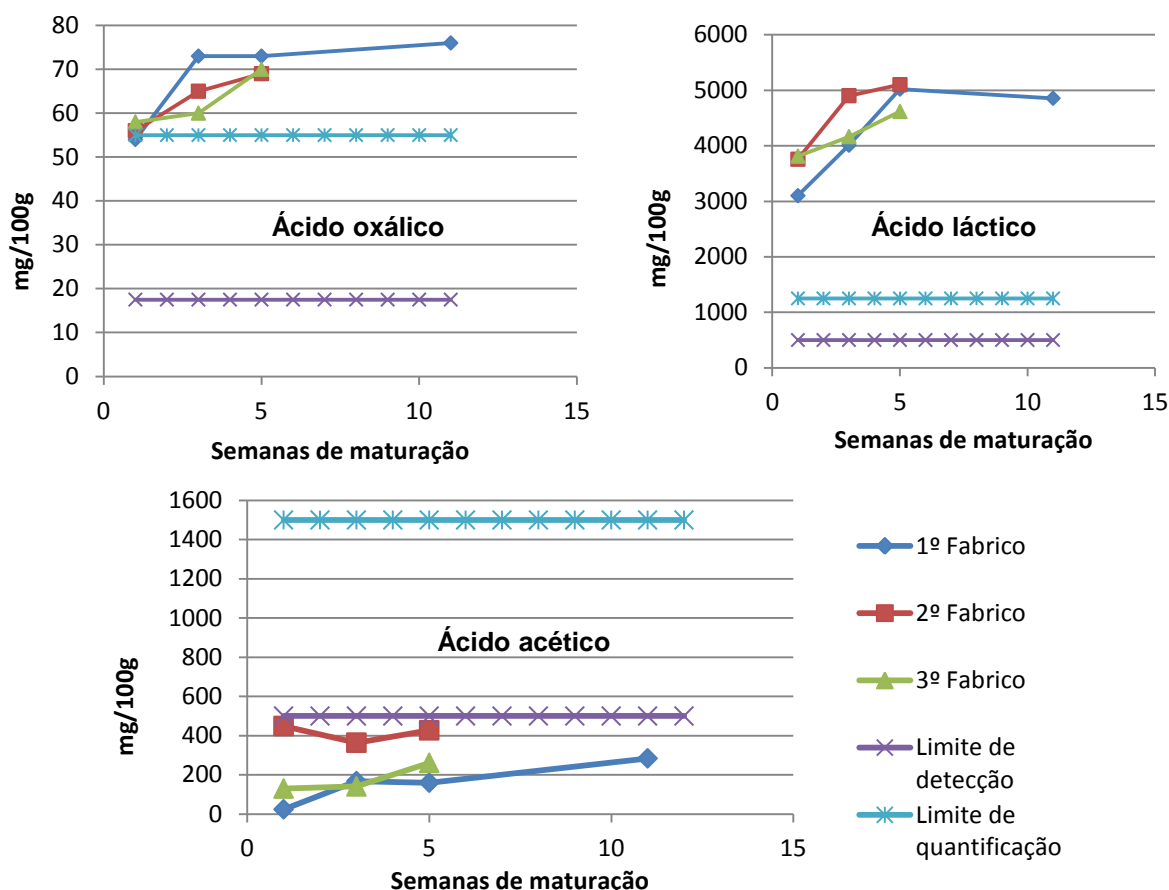


Figura 5 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico e acético em queijo Moledo

Em queijo Cheddar sul-africano, o teor mínimo de ácido oxálico encontrado por Lues (2000) foi de 141,8 mg/100 g. Observando a Figura 5 verifica-se que o teor máximo de ácido oxálico em queijo Moledo encontra-se abaixo dos 80 mg/100g, havendo que ter em conta as diferenças de matriz de análise e de tempo de maturação e as condições de determinação do teor em ácidos orgânicos, uma vez que o método de extracção dos ácidos orgânicos ou as condições cromatográficas, tais como a coluna, o fluxo ou o volume de injeção, não foram as mesmas que aquelas utilizadas pelo autor. A maturação do queijo Cheddar processa-se lentamente no fabrico caseiro e normalmente o queijo é vendido entre os 9 meses e os 2 anos de cura (Modesto e Barbosa, 2007).

Verifica-se que a concentração de ácido láctico em queijo Moledo (Figura 5) encontra-se sempre acima dos limites de detecção e quantificação ao longo do período de maturação em estudo. Este foi o ácido encontrado em maior quantidade neste tipo de queijo, revelando uma subida bastante acentuada, com um aumento de aproximadamente 1000 mg de ácido láctico no espaço de 5 semanas. A partir da 5ª semana estabiliza, havendo mesmo uma ligeira diminuição.

Verifica-se que as concentrações de ácido láctico obtidas para o queijo Moledo se encontram acima daquelas obtidas por Lues (2000). Este facto pode ser explicado não só pelas diferenças tanto no modo de fabrico como no método de extracção, mas é de referir que o ácido láctico é produzido sobretudo durante a glicólise, uma reacção primária. Talvez por isso o ácido láctico revele ser o ácido orgânico maioritário em queijo Moledo. As reacções secundárias como o metabolismo do lactato são as principais responsáveis pela formação dos ácidos acético, propiónico e butírico. Em queijo Moledo estas reacções não parecem ter uma acção relevante, como se pode observar na Figura 5 para o ácido acético, cujos resultados se encontram todos abaixo dos limites de detecção e quantificação.

No geral, as concentrações de ácido acético obtidas para o queijo Moledo são bastante superiores às que Lues (2000) obteve. Neste tipo de queijo não foi detectada a presença dos ácidos propiónico e butírico, por esta razão não se apresentam os gráficos correspondentes.

A concentração de ácido oxálico em queijo Ilha Azul (Figura 6) encontra-se sempre acima dos limites de detecção e quantificação ao longo do período de maturação em estudo. Para os três fabricos observa-se um claro aumento do teor de ácido oxálico ao longo da maturação. Até às 5/7 semanas, a concentração de ácido oxálico mantém-se semelhante nos 3 fabricos, ao nível do observado para o queijo Moledo. A partir daí, em condições de conservação, verifica-se um aumento contínuo, mais visível no 1º e 2º Fabrico, a níveis superiores ao verificado no produto anterior, duplicando os resultados obtidos para a primeira semana de maturação.

Quando comparamos os resultados obtidos com os de Lues (2000), verificamos que, tal como acontece para o queijo Moledo, não parecem haver semelhanças entre os queijos Cheddar Sul-Africano e Ilha Azul. Mais uma vez há que ter em conta que estamos perante dois queijos com características muito diferentes e cujas análises foram efectuadas em períodos de maturação diferentes. No entanto, o queijo Ilha Azul 2º Fabrico com 19 semanas de cura parece aproximar-se do valor mínimo de ácido oxálico obtido por Lues (2000).

A concentração de ácido láctico em queijo Ilha Azul encontra-se claramente acima dos limites de detecção e quantificação ao longo do tempo de maturação em estudo, o que pode ser verificado através da observação da Figura 6. Verifica-se um aumento de ácido láctico mais acentuado até às 5/7 semanas. A partir desse período, durante o período de conservação, a tendência parece ser para estabilizar.

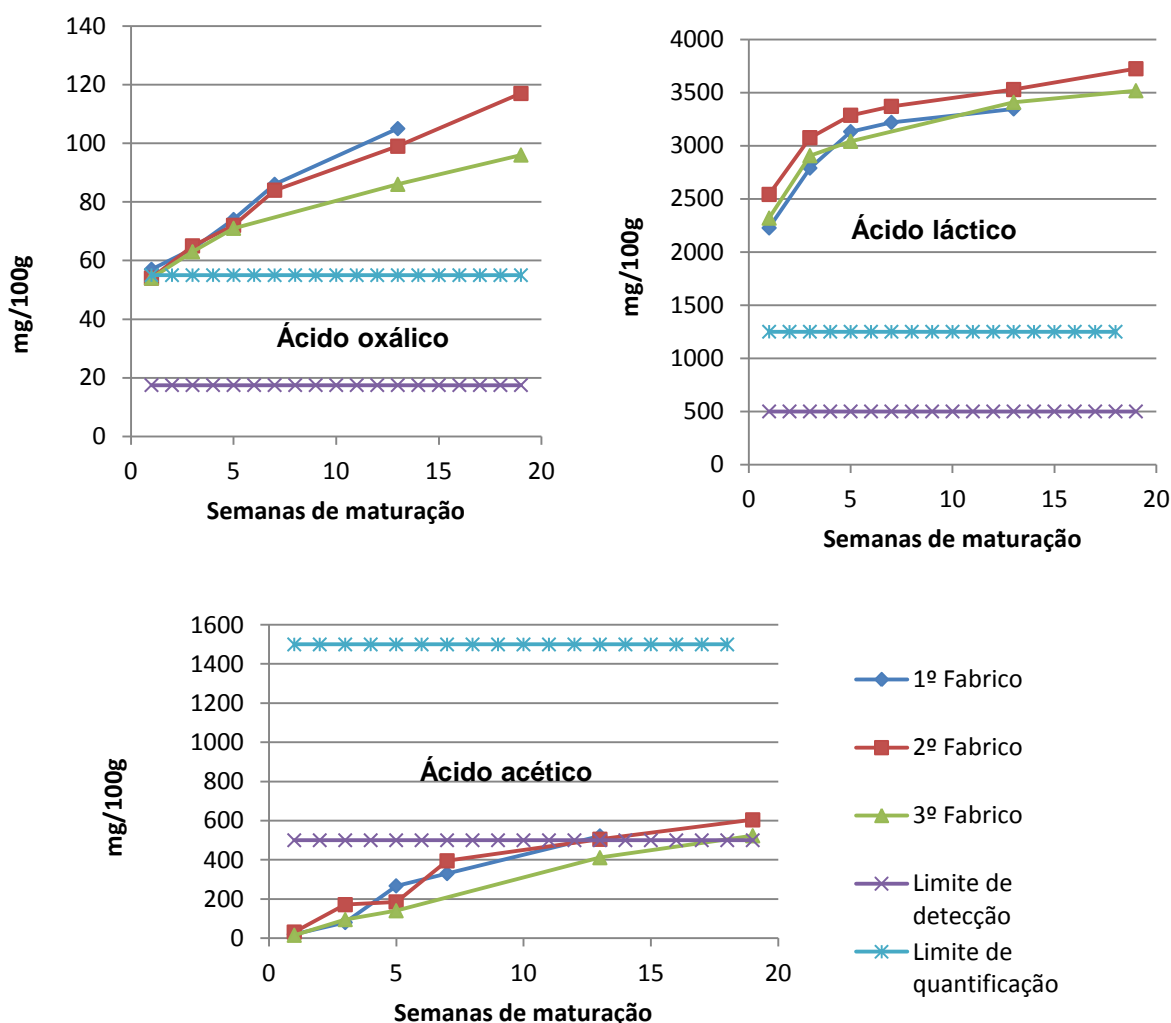


Figura 6 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico e acético em queijo Ilha Azul

Quando comparado com o queijo Moledo, o queijo Ilha Azul demonstra ter uma menor concentração inicial em ácido láctico e, apesar do período de maturação estudado ser superior, este não chega nunca a atingir os valores máximos de ácido láctico obtidos para o queijo Moledo, o que foi claramente sentido em observações sensoriais efectuadas (dados não apresentados). Trata-se claramente de um efeito resultante da tecnologia de fabrico; a um processamento da coalhada em cuba diferente (com deslactosagem ou lavagem da coalhada no queijo Ilha Azul), com teores de humidade iniciais superiores, o efeito da actividade microbiana é mais intenso no caso do queijo Moledo.

Com apenas uma semana de cura o queijo Ilha Azul já apresenta valores de ácido láctico semelhantes àqueles obtidos por Lues (2000) para o queijo Cheddar sul-africano e, à medida que a maturação evolui, o ácido láctico continua a aumentar a sua concentração.

O teor em ácido acético neste queijo apresenta também um aumento ao longo da maturação e também ao longo da conservação. As concentrações de ácido acético obtidas encontram-se, no entanto, todas abaixo do limite de quantificação e a grande maioria são também inferiores ao limite de detecção.

Embora os valores iniciais de ácido acético em queijo Ilha Azul se assemelhem aos valores iniciais no queijo Cheddar sul-africano detectados por Lues (2000), ao longo da maturação esses valores aumentam significativamente. Tendo em conta que o queijo Cheddar possui vários meses de cura, podemos afirmar com base nos resultados obtidos que o queijo Ilha Azul possui uma maior quantidade de ácido acético. O ácido acético pode ser formado a partir de diversas vias, incluindo através da metabolização do lactato, o que demonstra já a presença de transformações secundárias na maturação do queijo Ilha Azul, detectando-se concentrações superiores ao queijo Moledo. Para ambos, não foram detectados os ácidos propiónico e butírico.

Em queijo São Jorge, a concentração de ácido oxálico aumentou ao longo da maturação para ambas as origens, Topo e Uniqueijo (Figura 7). Até aos 60 dias de cura verifica-se uma maior quantidade de ácido oxálico na matriz Uniqueijo. A partir do 60º dia a matriz Topo apresenta uma maior concentração de ácido oxálico devido a uma subida mais acentuada a partir dos 45 dias de cura. Os resultados obtidos encontram-se acima dos limites de detecção e quantificação.

Qualquer dos queijos São Jorge, fabricados a partir de leite cru, apresenta uma maior concentração em ácido oxálico que os queijos Moledo e Ilha Azul. Com 15 dias de maturação, o queijo São Jorge já apresenta valores na ordem dos 118 a 179mg/100g de ácido oxálico e, aos 120 dias (aproximadamente 16 semanas), apresenta valores que rondam as 500mg/100g, o que é um valor bastante superior às 117mg/100g obtidas para o queijo Ilha Azul com 19 semanas.

Estes valores encontram-se bastante acima daqueles a que Lues (2000) chegou em queijo Cheddar, um tipo tecnológico de queijo que a bibliografia disponível associa ao fabrico de queijo São Jorge. Com apenas 15 dias de maturação, os valores já rondam o valor mínimo obtido pelo autor, enquanto o valor máximo obtido por Lues (2000) foi de 153,5 mg/100g. Com apenas cerca de 4 meses, o queijo São Jorge já ultrapassa as 500 mg de ácido oxálico em 100g de queijo. Tal facto confirma que o tempo de maturação não é o único factor determinante na evolução dos ácidos orgânicos e, em particular, do ácido oxálico. A utilização de leite cru ou pasteurizado no fabrico do queijo e o próprio tipo tecnológico de

queijo, pode ser determinante na evolução dos ácidos orgânicos ao longo do período de cura.

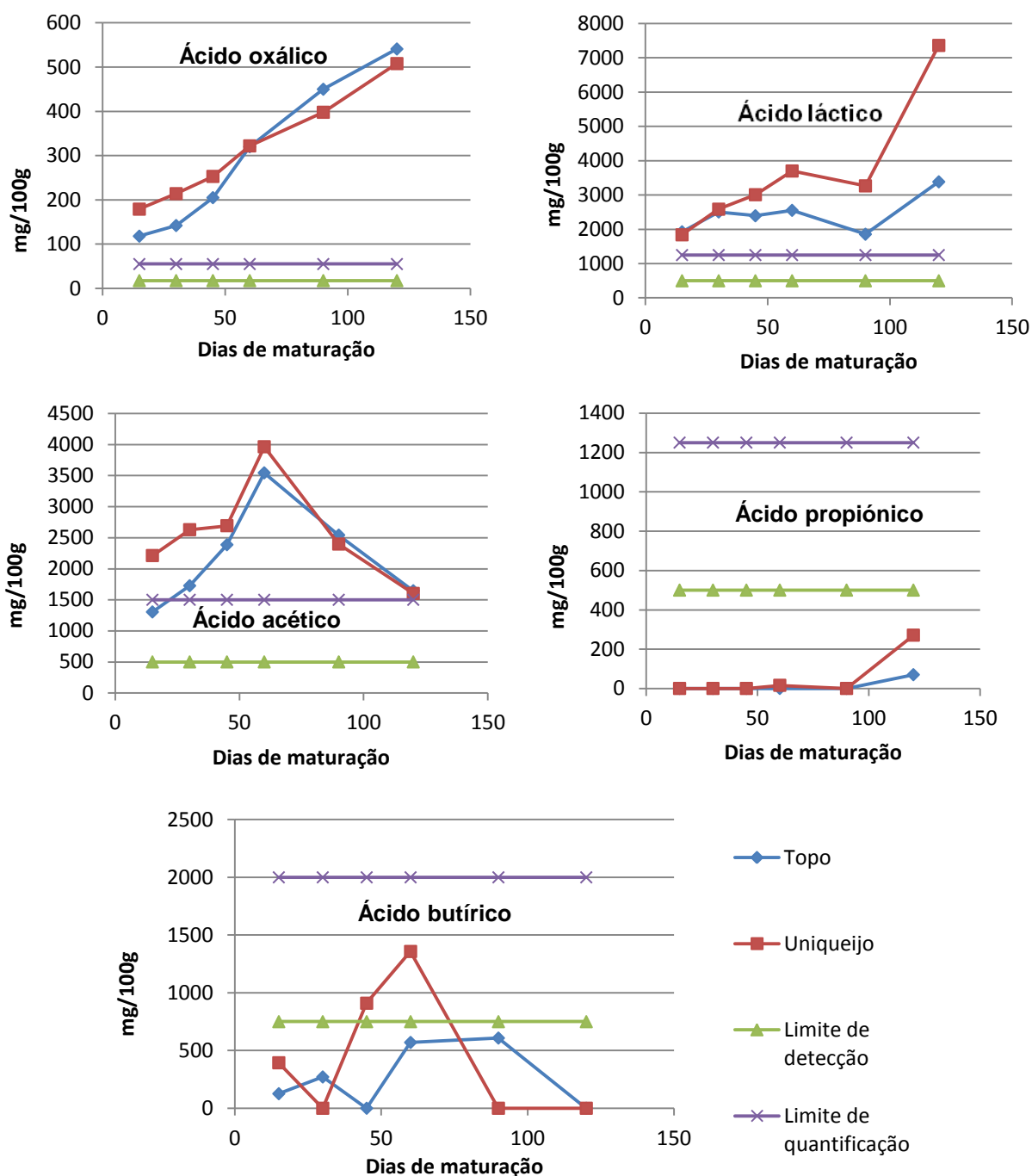


Figura 7 – Evolução dos ácidos oxálico, láctico, acético, propiónico e butírico em queijo São Jorge

O queijo São Jorge é fabricado a partir de leite cru de vaca. O leite de vaca cru possui uma maior quantidade e diversidade de bactérias lácticas, o que acelera o processo de

conversão do L-lactato a D-lactato e, como tal, a formação de ácidos orgânicos parece dar-se mais cedo durante a cura.

Pela observação da Figura 7 verifica-se que a evolução do ácido láctico em queijo S.Jorge ao longo do período de maturação em estudo é muito inconstante. A concentração de ácido láctico na matriz Topo aumentou até ao 30º dia, quase estabilizando posteriormente.

O queijo São Jorge Uniqueijo revela uma tendência semelhante à da matriz Topo mas, verifica-se um aumento constante da concentração de ácido láctico até aos 120 dias de cura. Ao longo do período de maturação em estudo as concentrações de ácido láctico encontram-se sempre acima dos limites de detecção e quantificação.

Os resultados obtidos quando comparados com os resultados referentes aos queijos feitos a partir de leite pasteurizado são bastante diferentes.

O queijo Moledo apresenta uma concentração inicial bastante superior ao São Jorge e com 5 semanas a evolução foi maior no Moledo. Tal facto também se pode comprovar pela distância às linhas de detecção e de quantificação, que é maior no caso do queijo Moledo.

Quanto à concentração final verificam-se diferenças entre as matrizes Topo e Uniqueijo. Enquanto o São Jorge Topo, com 19 semanas, apresenta valores inferiores ao queijo Moledo com apenas 5 semanas, o São Jorge Uniqueijo apresenta já valores mais elevados na ordem das 7000mg/100g.

Comparando o queijo São Jorge com o queijo Cheddar sul-africano (Lues, 2000) verifica-se que no caso da matriz Topo os resultados assemelham-se bastante ao longo de todo o período de maturação em estudo, embora pareça haver uma tendência para aumentar a partir dos 120 dias de maturação. No que diz respeito à matriz Uniqueijo os resultados não são tão semelhantes àqueles obtidos por Lues (2000).

Num queijo feito a partir de leite cru como é o caso de São Jorge, a quantidade de ácidos orgânicos presentes, no caso ácido láctico, parece ser maior. Neste tipo de queijos as reacções secundárias parecem ter um papel mais preponderante no aparecimento e desenvolvimento de ácidos orgânicos.

As reacções primárias têm também um papel decisivo no surgimento destes compostos, no entanto, à medida que a maturação evolui, as reacções secundárias parecem ter um papel mais activo, como tal, a produção de ácido láctico tende a estagnar. A um menor nível de presença de ácido láctico acaba por corresponder uma maior produção de outros ácidos

orgânicos, como o ácido acético. Aqui parece intervir o metabolismo do lactato, isto é, a utilização do ácido láctico como substrato para transformações secundárias.

A Figura 7 mostra a evolução do teor em ácido acético ao longo da maturação do queijo São Jorge e pode observar-se que os resultados obtidos encontram-se sempre acima do limite de detecção e, na maior parte do tempo, também se encontram acima do limite de quantificação.

Ambas as matrizes têm um comportamento semelhante, um aumento do teor em ácido acético até aos 60 dias de cura e posterior diminuição acentuada até aos 120 dias de cura.

A concentração inicial de ácido acético é muito maior no queijo São Jorge do que nos queijos Moledo e Ilha Azul. Com duas semanas de cura já possui um maior teor em ácido acético do que o queijo Moledo 2º Fabrico com 5 semanas e do que o Ilha Azul com 19 semanas. O teor máximo de ácido acético obtido para o queijo Moledo foi de 427 mg/100g, enquanto o queijo São Jorge Topo, com apenas 15 dias de cura, apresenta já um teor de 1304 mg/100g. Ambos os queijos têm origem em leite de vaca mas o leite utilizado na produção de queijo São Jorge é leite cru. Esta pode ser a principal causa de diferença no teor de ácido acético. Um queijo feito a partir de leite cru possui uma microflora muito mais diversa, como tal as reacções que ocorrem durante a maturação serão mais favoráveis ao aparecimento de características do queijo mais complexas, como a formação do flavour.

Como já foi dito anteriormente, os ácidos orgânicos são importantes precursores do flavour, podendo ser formados a partir do metabolismo do lactato. O ácido acético pode ser formado através de diferentes vias de metabolização do lactato. Assim podemos afirmar que o maior teor em ácido acético no queijo São Jorge deve-se provavelmente ao leite cru utilizado no seu fabrico.

Demarigny *et al.* (1997) verificaram que o teor em ácido acético em queijos do tipo Suíço feito a partir de leite cru aumentava durante a cura. No queijo São Jorge isso só parece ocorrer até ao 60º dia de cura.

Nos queijos de tipo suíço, é frequente a detecção de ácido propiónico, produzido pelas bactérias propiónicas a partir do lactato. A partir da Figura 7, verifica-se que a quantidade de ácido propiónico presente em ambas as matrizes de queijo São Jorge está sempre abaixo quer do limite de detecção, quer do de quantificação. O teor de ácido propiónico presente neste queijo é bastante baixo ou mesmo inexistente na maior parte do período de cura até ao 90º dia, sendo detectado aos 120 dias, de forma mais significativa na matriz Uniqueijo.

Quando comparados os teores em ácido propiónico do queijo São Jorge com os do queijo Ilha Azul verificam-se algumas semelhanças. Nas primeiras semanas de maturação verifica-se que ambos não revelam a presença de ácido propiónico. No entanto, em ambos os casos, com algumas semanas de cura já se observa a sua presença, embora abaixo do limite de detecção.

Os resultados obtidos indiciam um aumento do ácido propiónico ao longo da maturação conforme o obtido também por Demarigny *et al.* (1997) para queijos do tipo suíço, fabricado a partir de leite cru, e por Akalin *et al.* (2002) para queijo conservado em salmoura ("*pickled white cheese*").

De acordo com Lues (2000), o queijo Cheddar sul-africano revela valores de ácido propiónico que rondam os 30 a 110 mg/100g. A matriz Topo, ao 120º dia de cura, revela uma quantidade semelhante à encontrada por Lues.

A evolução do ácido butírico em queijo São Jorge ao longo do período de maturação (Figura 7) foi muito inconstante. Na matriz Topo foi detectado aos 15, 30, 60 e 90 dias, não sendo encontrado aos 45 e 120 dias. Na matriz Uniqueijo os valores obtidos encontram-se sempre abaixo do limite de quantificação.

Devido ao carácter inconstante deste ácido torna-se difícil uma comparação entre os queijos São Jorge, Moledo e Ilha Azul. No entanto, pode referir-se que, com apenas, 45 dias de maturação, a matriz Uniqueijo já ultrapassa o limite de detecção. Com 60 dias de cura, 100 g de queijo São Jorge Uniqueijo possuem 1358 mg de ácido butírico.

O teor de ácido butírico, quando detectado, em queijo São Jorge encontra-se sempre acima dos valores encontrados por Lues (2000), mas devido à irregularidade dos gráficos obtidos torna-se um pouco difícil uma comparação entre estes dois queijos. Akalin *et al.* (2002) concluíram que a concentração de ácido butírico aumentava ao longo da maturação do queijo conservado em salmoura. A inconstância de resultados poderá estar ligada à origem deste ácido, muito relacionada, segundo diversos autores, com o desenvolvimento de bolores no queijo, sem uma correlação identificada com uma via metabólica específica da maturação do queijo.

Vale a pena referir, ainda, o constante aparecimento, nos cromatogramas obtidos, de alguns picos cuja identificação falhou. Salienta-se a existência de dois desses picos, cuja área é bastante significativa e cujo aparecimento surgiu sempre por volta dos 14/15 minutos e 20/21 minutos consoante a matriz e o tempo de maturação.

Foram feitas diversas tentativas de identificação dos picos mencionados através da injeção de padrões de diferentes compostos. No entanto estas tentativas revelaram-se infrutíferas. Na Figura 8 pode observar-se que, na amostra Ilha Azul com 1 semana de maturação, já surgem ambos os picos referidos e que, ao fim de 19 semanas (cura+conservação) se verifica um claro aumento da área de ambos os picos.

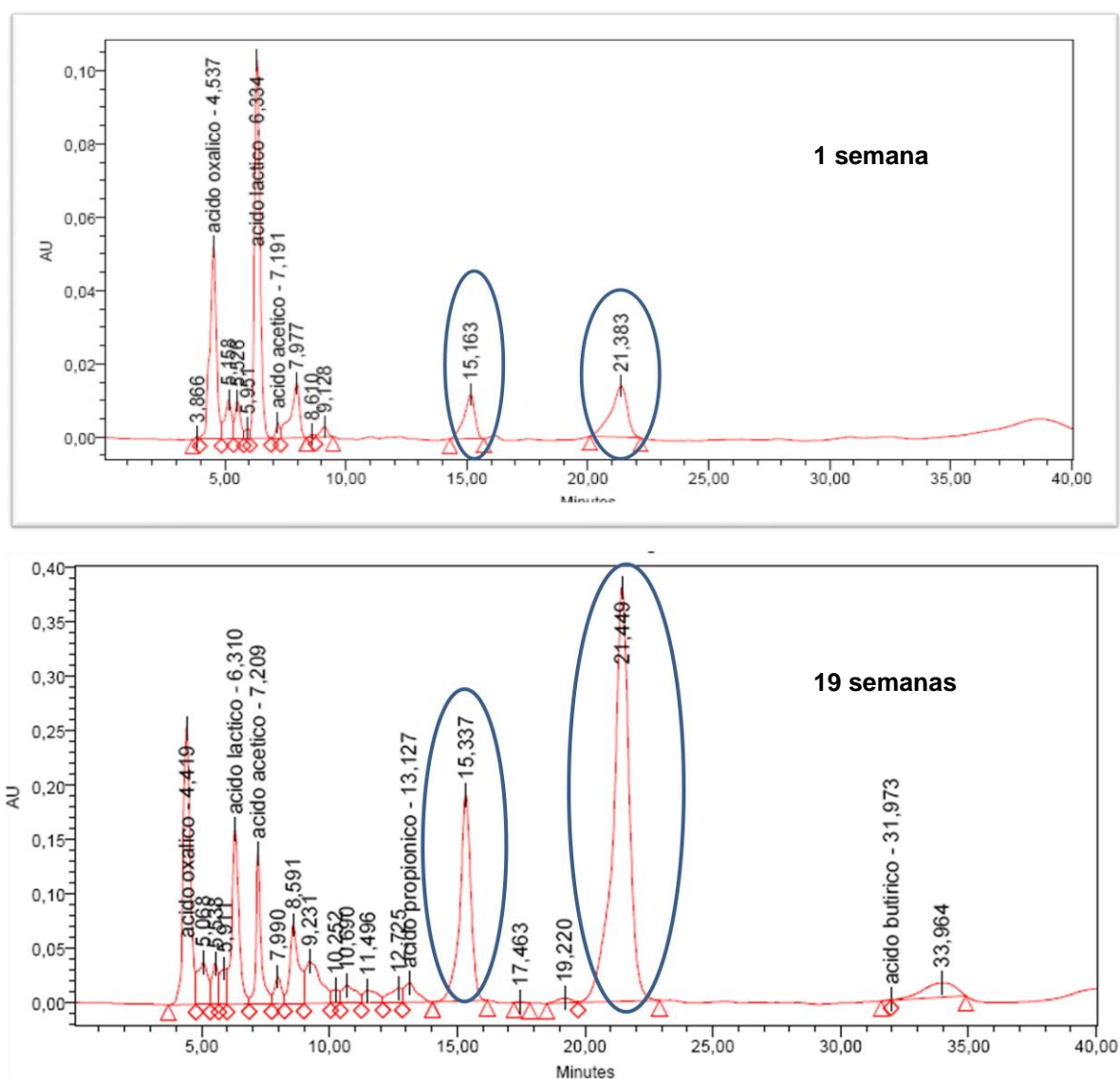


Figura 8 - Cromatogramas relativos a amostras de queijo Ilha Azul, com 1 e 19 semanas, com destaque para os dois grandes picos não identificados

Podemos assim verificar que parece haver uma tendência para um aumento da concentração destes compostos ao longo da cura do queijo Ilha Azul, o que sugere que o tempo de maturação influencia o desenvolvimento destes compostos. A observação dos cromatogramas referentes às amostras de queijo Moledo também corroboram esta

afirmação. Quando observamos os cromatogramas relativos às amostras de queijo São Jorge, um queijo cuja origem é em leite cru e não leite pasteurizado verifica-se também o aparecimento dos mesmos picos, com tendência para um aumento com o tempo de maturação.

A Figura 9 refere-se aos cromatogramas das amostras de queijo São Jorge com 15 e 120 dias de maturação respectivamente.

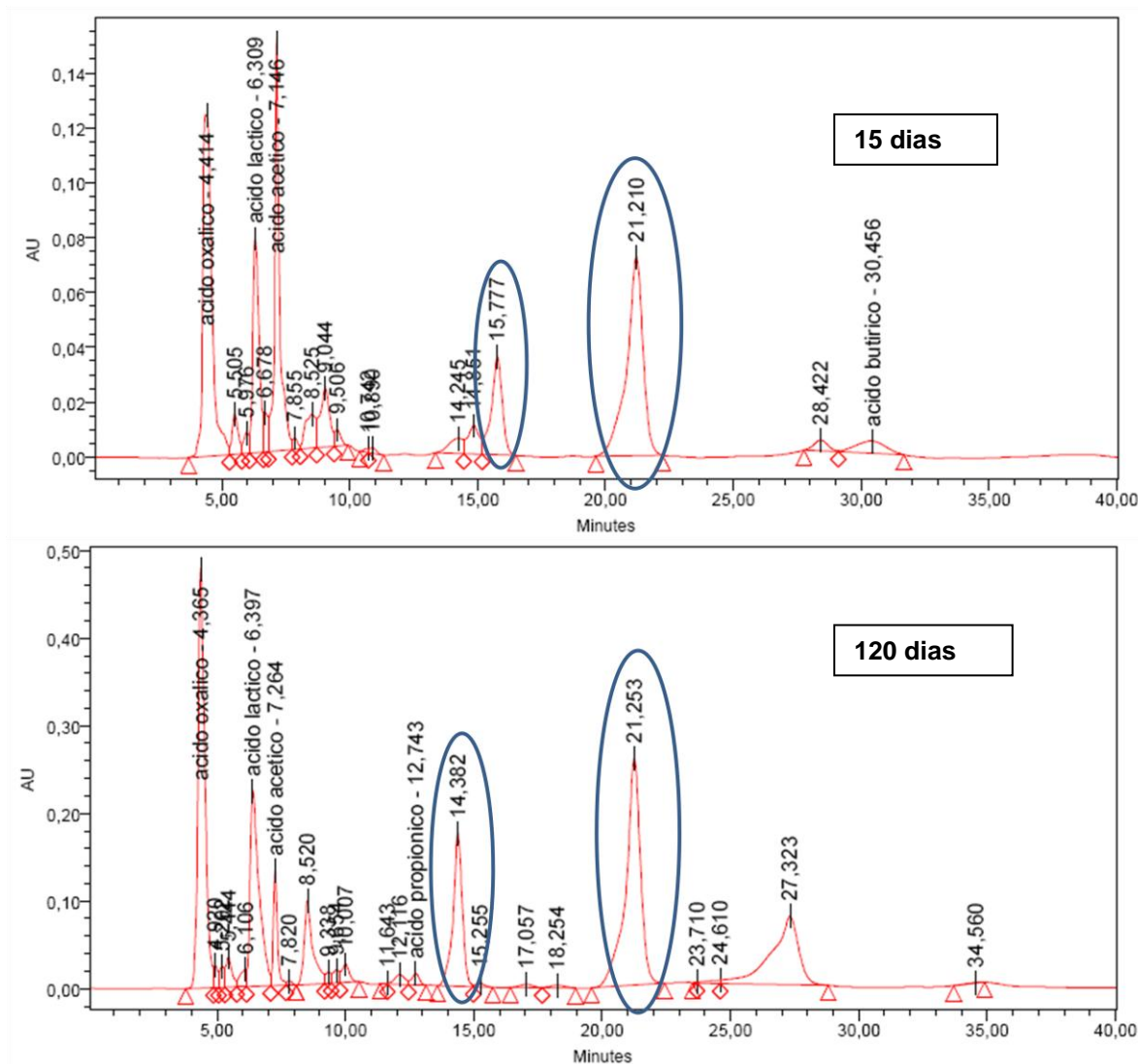


Figura 9 - Cromatogramas relativos às amostras de queijo São Jorge Uniqueijo com 15 e 120 dias de maturação, com destaque para os dois grandes picos não identificados

A título ilustrativo, apresenta-se o gráfico referente à evolução dos picos acima mencionados ao longo da maturação para o queijo São Jorge Uniqueijo (Figura 10). Como se pode observar, ao longo da maturação do queijo São Jorge Uniqueijo há um claro aumento da

área dos dois picos não identificados que ocorrem na análise por HPLC, detectados por volta dos 15-20 minutos.

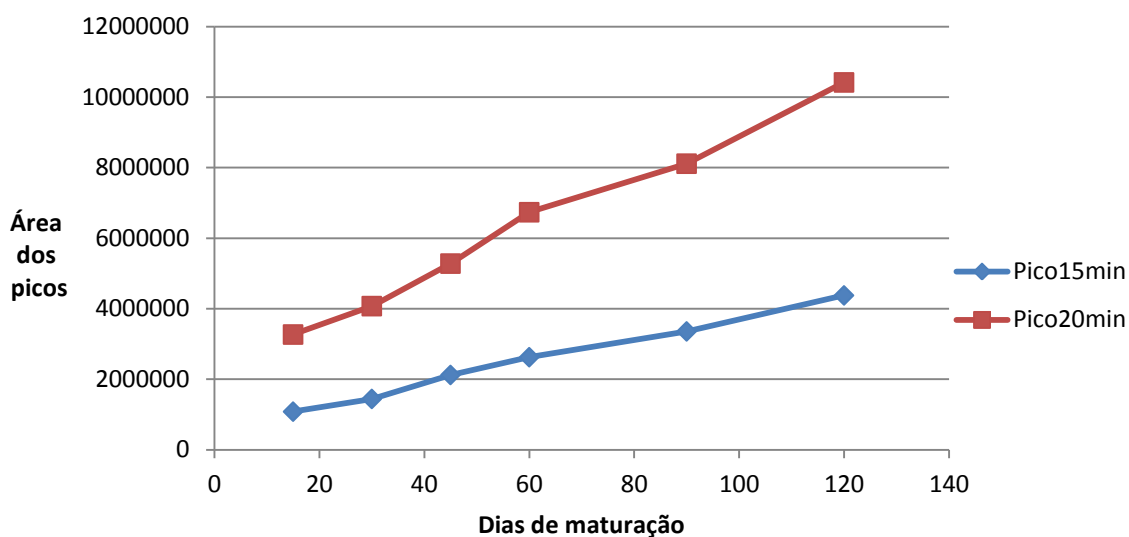


Figura 10 – Evolução da área dos picos não identificados ao longo da maturação em queijo São Jorge Uniqueijo

Apesar de todas as tentativas de identificação de ambos os picos se terem revelado infrutíferas, não será desprovido de sentido propôr uma investigação futura na qual um dos objectivos seja a tentativa de identificação destes dois picos.

4.3. Perfil e teor em ácidos orgânicos em diferentes tipos de queijos

No sentido de verificar a relação entre o perfil de ácidos orgânicos e os tipos de queijo analisados, foi efectuada uma avaliação através dos seguintes métodos estatísticos multivariados:

- Classificação Hierárquica (CH)/Análise de “clusters”
- Análise em Componentes Principais (ACP)

Na Figura 11 encontra-se representado o diagrama referente à classificação hierárquica para todas as amostras de queijos. Os códigos SEID e SEIE referem-se às amostras de queijo Serra da Estrela, enquanto os códigos Az1, Az2, Az3 e Az4 são referentes às amostras de queijo de Azeitão.

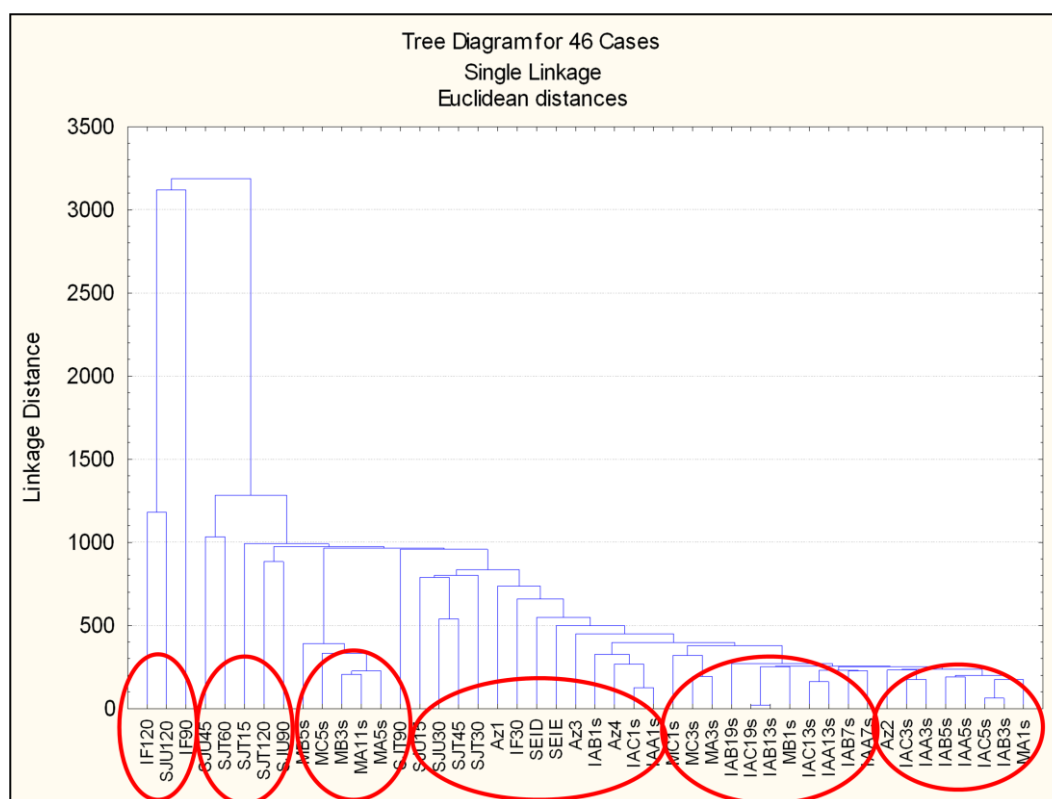


Figura 11 - Classificação Hierárquica – agregação das amostras a partir da composição em ácidos orgânicos dos diferentes tipos de cura

Pela observação da Figura 11 verifica-se uma agregação das amostras em diversos grupos de acordo com o tempo de cura, mas o tipo de tecnologia utilizada durante o fabrico também surge como factor determinante para as diferenças e semelhanças encontradas.

Numa observação mais cuidada pode distinguir-se a formação de 6 grupos principais. No geral verifica-se uma agregação das amostras dos queijos São Jorge e Flores com tempos de maturação mais longos, enquanto as de tempo de cura inferior formam um outro grupo. A maioria dos queijos Moledo agrega-se num pequeno grupo. Também se formam diversos pequenos grupos interligados entre si e constituídos por algumas amostras de São Jorge com tempos de cura mais curtos, três amostras de Azeitão, ambas as amostras de Serra da Estrela e as três amostras de Ilha Azul com 1 semana de maturação. Observa-se um 5º grupo constituído maioritariamente por amostras de queijo Ilha Azul já com algumas semanas de cura, mas também com algumas amostras de Moledo. Num 6º grupo formado maioritariamente por amostras de Ilha Azul com poucas semanas de cura, distingue-se ainda um queijo de Azeitão e um Moledo com apenas 1 semana de cura.

Os resultados obtidos segundo a classificação hierárquica indiciam uma tendência para uma agregação segundo os tempos de maturação e a tipologia de fabrico. Queijos com tempos

de cura mais curtos agrupam-se entre si. O mesmo se verifica com as amostras cujos tempos de maturação são mais longos. De um modo geral queijos fabricados a partir de leite cru parecem agregar-se entre si. O mesmo se verifica com os queijos feitos a partir de leite pasteurizado. Dos queijos obtidos a partir de leite cru verifica-se ainda uma separação entre os queijos de pasta dura como os de São Jorge e Flores e os de pasta mole como o Serra da Estrela e Azeitão.

A análise de “clusters” permitiu construir os Quadros XIX e XX, onde se encontram discriminados os grupos formados, consoante o número de grupos seja 5 ou 6.

Quadro XIX - Análise de “clusters” com 5 grupos

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
SJT90	MA5s	MA1s	IF90	IAA1s
SJU90	MA11s	MA3s	SJU120	IAA3s
SJT30	MB3s	MB1s	IF120	IAB1s
SJT45	MB5s	MC1s		IAC1s
SJT60	MC5s	MC3s		IAC3s
SJT120		IAA5s		Az1
SJU15		IAA7s		Az2
SJU30		IAA13s		Az3
SJU45		IAB3s		Az4
		IAB5s		SEID
		IAB7s		SJT15
		IAB13s		
		IAB19s		
		IAC5s		
		IAC13s		
		IAC19s		
		SEIE		
		IF30		

Pela análise do Quadro verifica-se algumas semelhanças com os grupos formados segundo a CH. O Grupo 1 é formado exclusivamente por São Jorge. O Grupo 2 é formado exclusivamente por amostras de Moledo, maioritariamente com cura mais longa. Já o Grupo 3 é o mais diversificado, sendo constituído maioritariamente por queijos Ilha Azul, mas neste grupo também se encontram as amostras de Moledo com menos tempo de cura, assim como as amostras SEIE e IF30. O Grupo 4 é aquele que mais se assemelha a um dos grupos detectados com a classificação hierárquica, o grupo formado pelas amostras SJU120 e IF120 e IF90. Por último o Grupo 5 apresenta também alguma diversidade, sendo

constituído por algumas amostras de Ilha Azul com menos tempo de cura, todos as amostras de Azeitão e pelas amostras SEID e SJT15.

Uma alteração no número de grupos causa muito poucas mudanças na constituição dos mesmos (Quadro XX). Uma das alterações foi a divisão do grupo 3, observado na análise de “clusters” com 5 grupos, em dois grupos. Outra diferença notada foi a transição das amostras IAA3s, IAC3s e Az2 para o actual Grupo 3. Aliás, um facto curioso é que os queijos amanteigados (Serra da Estrela e Azeitão) incluídos no trabalho e que revelaram apreciação sensorial deficiente por parte do painel de provadores, são exactamente aqueles que não estão incluídos no grupo 6, estando colocados no grupo 3. Isto parece indicar que o perfil de ácidos orgânicos pode dar uma contribuição interessante na classificação e avaliação da qualidade do queijo, uma vez que se estabeleçam perfis característicos para os diferentes tipos de queijo.

Quadro XX - Análise de “clusters” com 6 grupos

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
MA5s	MA3s	MA1s	IF90	SJT90	IAA1s
MA11s	MB1s	IAA3s	SJU120	SJU90	IAB1s
MB3s	MC1s	IAA5s	IF120	SJT30	IAC1s
MB5s	MC3s	IAA7s		SJT45	Az1
MC5s	IAA13s	IAB3s		SJT60	Az3
	IAB7s	IAB5s		SJT120	Az4
	IAB13s	IAC3s		SJU15	SEID
	IAB19s	IAC5s		SJU30	SJT15
	IAC13s	Az2		SJU45	
	IAC19s	SEIE			
	IF30				

Parece, assim, poder considerar-se que o perfil de ácidos orgânicos provenientes da metabolização da lactose e do lactato pode diferenciar os produtos finais e, portanto, fornecer indicações acerca da tecnologia de fabrico e do tipo de microrganismos dominantes no queijo

Para observar melhor a relação entre a agregação das amostras analisadas e o perfil de ácidos orgânicos, procedeu-se a uma ACP. Pela observação da Figura 12 verifica-se uma ligeira alteração do declive da curva dos valores próprios dos vectores que definem as componentes principais, a partir da segunda componente principal; no entanto, apenas a

partir da terceira componente principal se observa uma alteração mais acentuada do declive. Podemos ainda observar que as três primeiras componentes principais explicam aproximadamente 91% da variância, um valor considerado bastante aceitável.

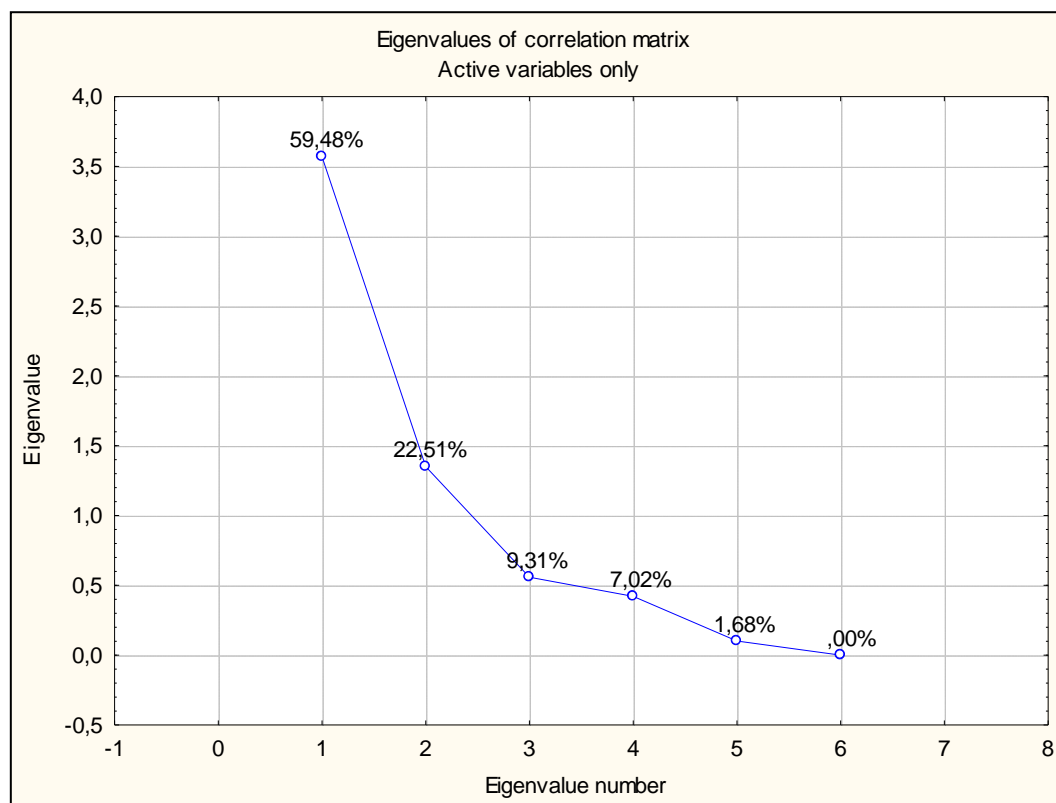


Figura 12 - ACP - Representação gráfica dos valores próprios em função do número de ordem da componente principal

Aproximadamente 91% da variância é explicada pelas três primeiras componentes principais, sendo que aproximadamente 59% da variância é explicada pela primeira componente principal, cerca de 23% pela segunda componente principal, enquanto a terceira componente principal explica cerca de 9% da variância (Quadro XXI).

Quadro XXI – ACP - Variância explicada por cada componente principal

	Valores próprios	Variância explicada (%)	Valores próprios acumulados	Variância explicada acumulada (%)
1	3,568781	59,47968	3,568781	59,4797
2	1,350374	22,50623	4,919155	81,9859
3	0,558856	9,31427	5,478011	91,3002
4	0,420990	7,01651	5,899002	98,3167
5	0,100994	1,68324	5,999996	99,9999
6	0,000004	0,00007	6,000000	100,0000

Com base nestas observações, optou-se por considerar o espaço tridimensional definido pelas três primeiras componentes principais. Os resultados obtidos relativos às correlações entre as variáveis e as três primeiras componentes principais são apresentados no Quadro XXII.

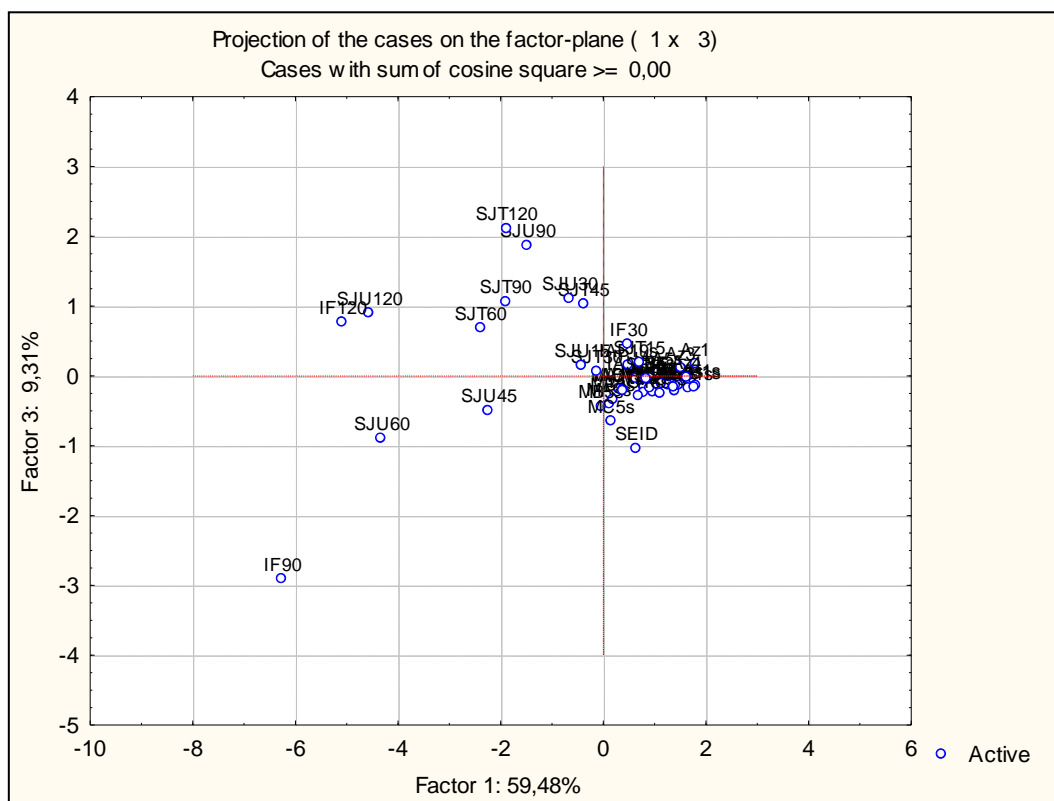
Quadro XXII - Correlação entre as variáveis e as componentes principais

	<i>CP₁</i>	<i>CP₂</i>	<i>CP₃</i>
OXAL	-0,847160	0,066281	0,474478
LACT	-0,474248	-0,827185	-0,062233
ACET	-0,833907	0,479611	0,171689
PROP	-0,739681	-0,367473	-0,246312
BUT	-0,673587	0,523611	-0,489584
Total	-0,964334	-0,150049	-0,003783

As figuras 13, 14 e 15 permitem observar a projecção das variáveis e das amostras sobre os planos definidos pelas três primeiras componentes principais, permitindo perceber as eventuais relações existentes entre as amostras e os ácidos orgânicos.

As variáveis referidas dizem respeito aos ácidos orgânicos analisados, oxálico, láctico, acético, propiónico e butírico e ainda ao total de ácidos orgânicos.





55



Pela Figura 13 podemos constatar que há algumas amostras que se destacam da maioria, nomeadamente as amostras de São Jorge e Ilha das Flores com maior tempo de maturação. As amostras SJU120 e IF120 estão associadas a valores totais de ácidos orgânicos mais elevados, sobretudo de ácido láctico, enquanto a amostra IF90 evidencia a presença dos ácidos acético e butírico. Grande parte das amostras de São Jorge está situada no 2º Quadrante, indiciando um maior teor em ácido acético, ácido butírico e ácido oxálico. Constata-se também que as amostras de Moledo e Ilha Azul apresentam um teor mais baixo em ácidos orgânicos, concentrando-se no lado direito do gráfico e muito perto da origem. Podendo observar-se que, na parte superior desta massa (1º quadrante) se situam os queijos tipo Ilha de tempo de cura incipiente e os queijos de Azeitão e Serra da Estrela.

Na Figura 14 encontram-se representados os gráficos referentes às projecções das variáveis e das amostras sobre o plano definido pela primeira e terceira componentes principais.

Verifica-se uma similaridade maior entre as amostras de Moledo e Ilha Azul, enquanto as amostras de queijo São Jorge e Flores revelam uma maior dispersão entre si consoante os tempos de cura. Mais uma vez observa-se que a amostra IF90 é aquela que apresenta um maior teor em ácido butírico e que a maior parte das amostras de São Jorge se dispersam no 2º e 3º quadrantes, revelando, no geral, uma maior presença de ácidos orgânicos.

A Figura 15 representa a projecção das variáveis e das amostras sobre o plano definido pela segunda e terceira componentes principais.

A observação da Figura 15 vem confirmar as observações efectuadas anteriormente, permitindo, no entanto, uma visualização diferente da projecção das variáveis e das amostras. Apesar da segunda e terceiras componentes juntas não explicarem mais de 32% da variância, observam-se algumas semelhanças com as projecções anteriores. A amostra IF90 parece ser de facto aquela com maior teor em ácido butírico.

Mais uma vez, verifica-se que as amostras de Moledo e Ilha Azul se associam entre si, não se distinguindo nenhuma correlação em particular, a não ser talvez alguma associação com o ácido láctico. No entanto, consegue observar-se uma maior dispersão entre estas amostras, percebendo-se que, apesar de semelhantes entre si, existem algumas diferenças. As duas projecções anteriores permitiram, ainda, uma maior distinção entre as amostras de São Jorge, corroborando a ideia de que o tempo de cura é determinante nas diferenças observadas no teor em ácidos orgânicos.

Estes métodos separam bem os queijos em função do tipo tecnológico, observando-se igualmente que o tempo e as condições de cura também contribuem para esta separação. Conseguem, de forma mais ou menos evidente, observar com algum pormenor, a forma como um conjunto de amostras heterogéneas se relacionam entre si, face ao perfil de ácidos orgânicos que apresentam.

5. Conclusões

Este estudo pretendeu detectar e quantificar ácidos orgânicos, assim como caracterizar a sua evolução ao longo da maturação de queijos, relacionando-a com as transformações bioquímicas que ocorrem durante este período. Tendo em conta os objectivos do trabalho e a escassa investigação efectuada entre nós neste campo, procurou-se otimizar e validar uma metodologia de estudo por HPLC de modo a obter resultados rápidos e credíveis. Concluiu-se que o método aplicado permite a aquisição de resultados fiáveis e com a qualidade devida, pois o mesmo revelou ser preciso e exacto, não evidenciando desvios à linearidade.

A evolução dos ácidos orgânicos foi estudada em diversos queijos oriundos do arquipélago dos Açores, de tipos tecnológicos diferentes, no âmbito de uma colaboração com o INOVA. No geral, observou-se um aumento do teor de ácidos orgânicos ao longo da maturação, com o queijo São Jorge a apresentar uma evolução mais inconstante, mas com uma tendência geral para o aumento da concentração.

Os resultados obtidos sugerem que a tecnologia de fabrico, nomeadamente as condições de maturação, assim como o tipo de leite utilizado, cru ou pasteurizado, influenciam a evolução da concentração e o perfil de ácidos orgânicos. Em queijo São Jorge, as reacções secundárias parecem ter um papel mais preponderante no aparecimento e desenvolvimento de ácidos orgânicos, com destaque para o metabolismo do lactato.

Entre os ácidos orgânicos estudados, o ácido láctico parece ser aquele que mais contribuiu para o aumento do teor geral em ácidos orgânicos. No geral, verificou-se que a concentração dos ácidos acético, láctico e oxálico aumentou ao longo da cura, exceptuando o ácido acético presente no queijo São Jorge, cuja concentração aumentou até ao 60º dia e posteriormente diminuiu. Os ácidos propiónico e butírico são praticamente inexistentes nas amostras de queijos Moledo e Ilha Azul. Em queijo São Jorge observou-se o aparecimento de algum ácido propiónico e ácido butírico, no entanto é de referir que o surgimento destes ácidos orgânicos só se verificou após algumas semanas de cura.

Os métodos estatísticos multivariados mostraram-se úteis na análise dos resultados do perfil de ácidos orgânicos.

Relativamente à classificação hierárquica, os resultados apontam para uma agregação de acordo essencialmente com o tempo de cura e a tecnologia de fabrico.

Quanto à análise em componentes principais verificou-se que 91% da variância era explicada pelas três primeiras componentes principais e as projecções efectuadas corroboraram a ideia de que os queijos se distinguem ou se agrupam de acordo com o tempo de cura e a tecnologia de fabrico. Dentro da tecnologia de fabrico, o tipo de leite utilizado no fabrico do queijo é um factor importante a considerar, uma vez que pode determinar a componente microbiana relevante para as reacções bioquímicas, nomeadamente o metabolismo da lactose e do lactato, que parecem determinar as diferenças existentes, ao longo da cura, entre os diversos produtos.

Trabalhos futuros

Durante a realização do trabalho prático surgiram alguns obstáculos, um dos quais foi relatado no decorrer do presente trabalho escrito, nomeadamente o aparecimento de dois picos de dimensões consideráveis nos cromatogramas. Os picos referidos surgiram aproximadamente aos 14/15 minutos e aos 20/21 minutos de corrida do HPLC. Assim como trabalho futuro sugere-se uma tentativa de identificação destes picos por forma a perceber se um deles ou ambos representa um composto de relevância no queijo, ou mesmo um ácido orgânico ou se será apenas ruído do equipamento.

Também se propõe um estudo com o objectivo de aperfeiçoar o método utilizado por forma a torná-lo mais expedito e eficiente.

Um aspecto interessante pode ser, ainda, o estudo sobre a possibilidade de se encontrar e estabelecer perfis característicos para os diferentes tipos de queijo, com boa correlação com as propriedades sensoriais dos produtos, contribuindo para a classificação e avaliação da qualidade do queijo. Uma avaliação mais pormenorizada da evolução dos diferentes ácidos orgânicos ao longo da maturação e dos respectivos teores no final da maturação, poderá proporcionar índices de avaliação importantes, uma vez que estes compostos têm um contributo assinalável para os aspectos sensoriais do queijo.

6. Referências bibliográficas

- Adda, J., J. C. Gripon, and L. Vassal, (1982). The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chem.* 9:115-129.
- Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolax, D. & Leung, T., (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J.Food Microbiol.* 69:25-36
- Akalin, A.S., Gonc, S. & Akbas, Y., (2002). Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. *J.Dairy Sci.* 85:1670-1676.
- BANDEIRA, P. R. A. da S., (2010). *Desenvolvimento de um Queijo Fresco de Cabra com Contribuição da Fermentação Láctica*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Bevilacqua, A.E. & Califano, A.N., (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *J.Food Sci.* 54:1076-1079.
- Bevilacqua, A.E. & Califano, A.N., (1992). Changes in organic acids during the ripening of Port Salut Argentino cheese. *Food Chem.* 43:345-349
- Bouzas, J., Kantt, C.A., Bodyfelt, F. & Torres, J.A., (1991). Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 56:276-278.
- Bouzas, J., Kantt, C.A., Bodyfelt, F. & Torres, J.A., (1993). Time and temperature influence on chemical aging indicators for a commercial Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 58:1307-1312.
- Canada, J.S.B., (1998). Caracterização dos Queijos Tradicionais Portugueses. *Via Láctea* 12:32-34.

- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripo, J. C., Lambert, G., Lenoir, J. e Tourneur, C., (1987). Os fenómenos microbiológicos e enzimáticos, e a bioquímica da cura (maturação). In: Eck, A. (coord.) *O Queijo*, Vol. 1. Publicações Europa - América, Mem Martins.
- COLLINS, F.Y., MCSWEENEY, L.H.P. e WILLINSON, G.M., (2003). - Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13:841-866.
- Deeth, H. C. e Fitz-Gerald, C. H., (1995). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In: Fox. P. F. *Advanced Dairy Chemistry - 2: Lipids* 2nd ed. Chapman & Hall, London. pp. 247-308.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Buchin, S., Pochet, S & Grapiin, R., (1997). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheese: II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait*, 77:151-167.
- Dybing, S.T., Wiegand, J.A., Brudvig, S.A., Huang, E.A. & Chandan, R.C., (1988). Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 71:1701-1710.
- Eck, A. (coord.) (1987). *O Queijo*, Vol. 1. Publicações Europa - América, Mem Martins.
- Farkye, N. Y., and P.F. Fox., (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 1:37-40.
- Ferreira, S., (2006). *Implementação e validação de um Método Cromatográfico HPLC para a Detecção e Quantificação do Glicomacropéptido (GMP) em Amostras de Leite em Pó*. Faro: Universidade do Algarve. Relatório de Estágio
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P., (2004). *CHEESE Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition; Volume 1 General Aspects; ELSEVIER Academic Press, London, UK.

- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P., (2004a).CHEESE Chemistry, Physics and Microbiology; Third Edition; Volume 2 Major Cheese Groups; ELSEVIER Academic Press, London, UK.
- Fox, P. F. e Wallace, J. M., (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. Appl.Microbiol.* 45:17-85.
- Garde, S., Ávila, M., Gaya, P., Arias, R., Nuñez, M. Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of lactate-blowing defect. . *Int. Dairy J.* (2012), doi: 10.1016/j.idairyj.2012.01.005.
- Gaucheron, F. (coord.) (2004). *Minéraux et produits laitiers*. Éditions Tec&Doc, Lavoisier, Paris
- Gomes, P. A. C., (2011). *Evolução das características físico-químicas e da maturação em Queijo Amarelo e Queijo Picante da Beira Baixa DOP: - Composição, fracções azotadas e ácidos gordos livres*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar.
- Gomes, A. M., Kongo, J.M., Malcata, F.X., McSweeney, P.L.H., (2009). Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry* 112:131-138.
- Guia RELACRE 13, (2000). Validação de métodos internos de ensaio em análise química
- IDF 27 (1964) *Determination of Ash Content*. International Organization for Standardization
- ISO 5534 (2004) *Cheese and processed cheese -- Determination of the total solids content*. International Organization for Standardization
- ISO 5943 (2006) *Cheese and processed cheese products -- Determination of chloride content -- Potentiometric titration method*. International Organization for Standardization

- ISO 1740 (2004) *Milkfat products and butter -- Determination of fat acidity*. International Organization for Standardization
- ISO 8070 (2007) *Milk and milk products -- Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents -- Atomic absorption spectrometric method*. International Organization for Standardization
- Izco, J.M., Tormo, M. & Jimenez-Flores, R., (2002). Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 85:2122-2129.
- Law, B., (1984). Flavor development in cheeses. Pages 187-208 in *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. F.L. Davies and B. Law, ed. Elsevier Sci., Inc., New York, NY.
- Law, B.A., (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: Fox, P.F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol.1) General Aspects Elsevier Applied Science Publishers, London. pp. 365-392.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K. e Gilles, J., (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70:1748-1760.
- Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J. L., (1983). L'élaboration d'un fromage: exemple du Camembert. *Pour la Science*, 30-42. Cit. por Mietton, B., Gaucheron, F., Salaün-Michel, F. (2004).
- Liu, S.-Q., (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. Dairy J. of Food Microbiology* 83:115-131.
- Lues, J.F.R., Botha, W.C. & Smit, E.J., (1999). Ion-exchange HPLC analysis of a broad spectrum of organic acids from matured Cheddar cheese and assessment of extraction methods. *Elsevier Applied Science Publishers*. 31:441-447.

- Lues, J.F.R., (2000). Organic Acid and Residual Sugar Variation in a South African Cheddar Cheese and Possible Relationships with Uniformity. *J. Food Composition and Analysis*. 13:819-825.
- Macedo, A.C. e Malcata, F.X., (1997). Changes of lactose, lactic acid, and acetic acid contents in Serra cheese during ripening. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204:453-455.
- Martins, A. P. L., (2009). *Lacticínios I. Sebenta. Lacticínios – Mestrado em Engenharia Alimentar*. Instituto Superior de Agronomia.
- Matissek, R. & Wittkowski, R., (1993). *High performance liquid chromatography in food control and research*. Technomic Pub. Co. Lancaster.
- McSweeney, P.L.H., & Sousa, M.J., (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80:293-324.
- Mietton, B., Gaucheron, F., Salaün-Michel, F., (2004). Minéraux et transformations fromagères. In: Gaucheron, F. (coord.). 2004. *Minéraux et produits laitiers*. Éditions Tec&Doc, Lavoisier, Paris, pp. 472-563.
- NP 2105:1983 (1ª Edição) Queijos. Determinação do teor de matéria gorda. Técnica de Van Gulik. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade.
- Pearce, K.N., Creamer, L.K. & Gilles, J., (1973). Calcium lactate deposits on rindless Cheddar cheese. *NZ. J. Dairy Sci. Technol.* 8:3-7.
- Piveteau, P., (1999). Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait*. 79:23-41
- Ramos, J. M. S., (2009). *Efeito da refrigeração em leite de ovelha – evolução da flora microbiana e efeito na aptidão tecnológica para queijo*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica- Produção Animal. Instituto Superior de Agronomia e Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- R.Scott, (1986). *Cheesemaking practice*; Second Edition, Elsevier Applied Science Publishers; London & New York .

- Seitz, E. W., (1990). Microbial- and enzyme-induced flavors in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 73:3664-3691.
- Severn, D.J., Johnson, M.E., Olson, N.F., (1986). Determination of lactic acid in Cheddar cheese and calcium lactate crystals. *J. Dairy Sci.* 69:2027-2030.
- Spreer, E., (1991). *Lactologia Industrial*. Editorial Acribia, S.A. 2ª Edicion; Zaragoza.
- Tavaría, F.K., Ferreira, A.C.S. & Malcata, F.X., (2004). Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela cheese. *J. Dairy Sci.* 87:4064-4072.
- Thomas, T.D., McKay, L.L. & Morris, H.A., (1985). Lactate metabolism by *pediococci* isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:908-913.
- Thomas, T.D., (1986). Oxidative activity of bacteria from Cheddar cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 21:37-47.
- Thormo, M. & Izco, J.M., (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A* 1033:305-310.
- UITA, (2011). Análise de Aminas Biogénicas por HPLC
- Urbach, G., (1993). Relations between cheese flavor and chemical composition. *Int. Dairy J.* 3:389-422.
- Yvon, M., Rijnen, L., (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11:185-201.

6.1. Outra Bibliografia Consultada

- Harbutt, J., (2010). *Queijos do mundo*; Dorling Kindersley – Civilização, Editores L.^{da}, Porto .

- Modesto, M.L. & Barbosa, M., (2007). *Queijos portugueses e um olhar gastronómico sobre famosos queijos europeus*; Editorial Verbo.

6.2. Cibergrafia

- ANIL (2012) In: <http://www.anilact.pt/> (consultado a 03/05/2012)
- MARQUES, G. (2005) Análise em componentes principais – Processamento Estatístico de Sinais. In: <http://www.deetc.isel.ipl.pt/comunicacoesep/disciplinas/pes/pca.pdf> (consultado a 12/09/2012)
- MARQUES, J.C. (2007) HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência. In: <http://www3.uma.pt/jcmarques/docs/gaii/QAII4HPLC2007JCM.pdf> (consultado a 17/05/2012)
- RODRIGUES, P.C. & BRANCO, J.A. (2006) A Análise de Componentes Principais sobre dados dependentes. In: <http://www.spe2006.ubi.pt/Files/apres/A%20an%C3%A1lise%20de%20componentes%20principais%20sobre%20dados%20dependentes.pdf> (consultado a 12/09/2012)
- Thermo Scientific (2012) <http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/techresource?resourceId=87401&storeId=11152&from=search#> (consultado a 18.01.2012)

Anexos

Concentrações dos ácidos orgânicos em queijo Moledo

1º FABRICO	M1	M2	M3	M1_11sem
[oxálico] (mg/100g)	54	73	73	76
[láctico] (mg/100g)	3101	4010	5021	4856
[acético] (mg/100g)	24	168	160	284
[propiónico] (mg/100g)	0	0	43	0
[butírico] (mg/100g)	0	0	0	0
Total (mg/100g)	3179	4251	5297	5216

2º FABRICO	M2_7dias	M2_3sem	M2_5sem
[oxálico] (mg/100g)	56	65	69
[láctico] (mg/100g)	3758	4903	5101
[acético] (mg/100g)	449	364	427
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0
[butírico] (mg/100g)	0	59	119
Total (mg/100g)	4263	5391	5716

3º FABRICO	M3_1sem	M3_3sem	M3_5sem
[oxálico] (mg/100g)	58	60	70
[láctico] (mg/100g)	3813	4165	4618
[acético] (mg/100g)	130	141	261
[propiónico] (mg/100g)	1	0	0
[butírico] (mg/100g)	0	0	229
Total (mg/100g)	4002	4366	5178

Concentrações dos ácidos orgânicos em queijo Ilha Azul

1º FABRICO	IA1_1sem	IA1_3sem	IA1_5sem	IA1_7sem	IA1_13sem	IA1_19sem
[oxálico] (mg/100g)	57	64	74	86	105	300
[láctico] (mg/100g)	2227	2790	3133	3220	3347	4172
[acético] (mg/100g)	20	80	267	330	522	2104
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0	0	14	681
[butírico] (mg/100g)	0	0	0	84	47	0
Total (mg/100g)	2304	2934	3474	3720	4035	7257

2º FABRICO	IA2_1sem	IA2_3sem	IA2_5sem	IA2_7sem	IA2_13sem	IA2_19sem
[oxálico] (mg/100g)	54	65	72	84	99	117
[láctico] (mg/100g)	2542	3076	3287	3371	3529	3725
[acético] (mg/100g)	31	171	185	395	505	604
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0	0	69	0
[butírico] (mg/100g)	0	0	0	0	0	0
Total (mg/100g)	2627	3312	3544	3850	4202	4446

3º FABRICO	IA3_1sem	IA3_3sem	IA3_5sem	IA3_7sem	IA3_13sem	IA3_19sem
[oxálico] (mg/100g)	54	63	71	287	86	96
[láctico] (mg/100g)	2319	2907	3042	2928	3409	3518
[acético] (mg/100g)	15	95	140	1912	411	523
[propiónico] (mg/100g)	0	0	38	288	0	71
[butírico] (mg/100g)	0	0	0	0	143	0
Total (mg/100g)	2388	3065	3291	5415	4049	4208

Concentrações dos ácidos orgânicos em queijo dos Açores

São Jorge Topo	15dias	30dias	45dias	60dias	90dias	120dias
[oxálico] (mg/100g)	118	142	205	320	450	541
[láctico] (mg/100g)	1928	2506	2395	2553	1857	3385
[acético] (mg/100g)	1304	1726	2386	3543	2541	1645
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0	0	0	70
[butírico] (mg/100g)	126	271	0	570	608	0
Total (mg/100g)	3476	4645	4986	6986	5456	5641

São Jorge Uniqueijo	15dias	30dias	45dias	60dias	90dias	120dias
[oxálico] (mg/100g)	179	214	253	322	398	508
[láctico] (mg/100g)	1840	2587	3009	3700	3267	7361
[acético] (mg/100g)	2212	2628	2692	3963	2397	1602
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0	16	0	271
[butírico] (mg/100g)	394	0	910	1358	0	0
Total (mg/100g)	4625	5429	6864	9359	6062	9742

Flores	30dias	90dias	120dias
[oxálico] (mg/100g)	139	324	495
[láctico] (mg/100g)	2727	4018	6549
[acético] (mg/100g)	1216	3394	2450
[propiónico] (mg/100g)	0	422	353
[butírico] (mg/100g)	0	1546	0
Total (mg/100g)	4082	9704	9847

Concentrações dos ácidos orgânicos em queijo Azeitão e Serra da Estrela

Azeitão	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
[oxálico] (mg/100g)	106	49	82	72
[láctico] (mg/100g)	1622	2812	1896	2200
[acético] (mg/100g)	197	289	557	227
[propiónico] (mg/100g)	0	0	0	0
[butírico] (mg/100g)	0	0	0	0
Total	1925	3150	2535	2499

Serra da Estrela	IE	ID
[oxálico] (mg/100g)	77	66
[láctico] (mg/100g)	2903	1918
[acético] (mg/100g)	705	506
[propiónico] (mg/100g)	24	106
[butírico] (mg/100g)	0	346
Total	3709	2942

Tabelas de cálculo da preparação das soluções-mãe e de padrões dos cinco ácidos orgânicos

1. Soluções-mãe

	massa teórica (g)	balão (mL)	[] prevista (mg/mL)	massa pesada (g)	[] real (mg/mL)
ácido oxálico	0,1	50	2	0,1003	2,006
ácido láctico	0,8	20	40	0,8079	40,395
ácido acético	0,8	20	40	0,8014	40,07
ácido propiónico	0,8	20	40	0,8392	41,96
ácido butírico	0,8	20	40	0,8099	40,495

2. Padrões-mistos para injeção

Padrão 1 – balão 200 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	0,5	5,015
ácido láctico	0,5	100,9875
ácido acético	0,5	100,175
ácido propiónico	0,5	104,9
ácido butírico	0,5	101,2375

Padrão 2 – balão 100 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	0,5	10,03
ácido láctico	0,5	201,975
ácido acético	0,5	200,35
ácido propiónico	0,5	209,8
ácido butírico	0,5	202,475

Padrão 3 – balão 100 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	1,0	20,06
ácido láctico	1,0	403,95
ácido acético	1,0	400,7
ácido propiónico	1,0	419,6
ácido butírico	1,0	404,95

Padrão 4 – balão 100 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	2,5	50,15
ácido láctico	2,5	1009,875
ácido acético	2,5	1001,75
ácido propiónico	2,5	1049
ácido butírico	2,5	1012,375

Padrão 5 – balão 20 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	1,0	100,3
ácido láctico	1,0	2019,75
ácido acético	1,0	2003,5
ácido propiónico	1,0	2098
ácido butírico	1,0	2024,75

Padrão 6 – balão 20 mL

	volume (mL)	[] (µg/mL)
ácido oxálico	1,5	150,45
ácido láctico	1,5	3029,625
ácido acético	1,5	3005,25
ácido propiónico	1,5	3147
ácido butírico	1,5	3037,125

Teste de homogeneidade de variâncias – teste T para o ácido oxálico

Teste T – ácido oxálico: duas amostras com variâncias iguais		
	H₂O	KH₂PO₄ pH=2
Média	961002,7471	475983,8882
Variância	33865929959	26582483379
Observações	8	8
Variância agrupada	30224206669	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	5,579704072	
P(T<=t) uni-caudal	3,39337E-05	
t crítico uni-caudal	1,761310115	
P(T<=t) bi-caudal	6,78674E-05	
t crítico bi-caudal	2,144786681	

Teste T – ácido oxálico: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>KH₂PO₄ pH=2</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	475983,8882	860431,5737
Variância	26582483379	45048928210
Observações	8	8
Hipótese de diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	-4,062847201	
P(T<=t) uni-caudal	0,000671784	
t crítico uni-caudal	1,770933383	
P(T<=t) bi-caudal	0,001343569	
t crítico bi-caudal	2,160368652	

Teste T – ácido oxálico: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	961002,7471	860431,5737
Variância	33865929959	45048928210
Observações	8	8
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	1,012602793	
P(T<=t) uni-caudal	0,16421574	
t crítico uni-caudal	1,761310115	
P(T<=t) bi-caudal	0,32843148	
t crítico bi-caudal	2,144786681	

Teste de homogeneidade de variâncias – teste F para o ácido oxálico

Teste F – ácido oxálico: duas amostras para variâncias iguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2</i>
Média	961002,7471	475983,8882
Variância	33865929959	26582483379
Observações	8	8
gl	7	7
F	1,273994212	
P(F<=f) uni-caudal	0,378744744	
F crítico uni-caudal	3,78704354	

Teste F – ácido oxálico: duas amostras para variâncias desiguais		
	<i>KH₂PO₄ pH=2</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	475983,8882	860431,5737
Variância	26582483379	45048928210
Observações	8	8
gl	7	7
F	0,590080262	
P(F<=f) uni-caudal	0,251520632	
F crítico uni-caudal	0,264058226	

Teste F – ácido oxálico: duas amostras para variâncias desiguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	961002,7471	860431,5737
Variância	33865929959	45048928210
Observações	8	8
gl	7	7
F	0,751758839	
P(F<=f) uni-caudal	0,3580495	
F crítico uni-caudal	0,264058226	

Teste de homogeneidade de variâncias – teste T para o ácido láctico

Teste T – ácido láctico: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.0</i>
Média	2742294,25	2754247,5
Variância	2466003248	5549570984
Observações	8	8
Hipótese de diferença de média	0	
gl	12	
Stat t	-0,377627554	
P(T<=t) uni-caudal	0,356150838	
t crítico uni-caudal	1,782287548	
P(T<=t) bi-caudal	0,712301677	
t crítico bi-caudal	2,178812827	

Teste T – ácido láctico: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>KH₂PO₄ pH=2.0</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	2754247,5	2779448,875
Variância	5549570984	2182099159
Observações	8	8
Variância agrupada	3865835071	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	-0,810648478	
P(T<=t) uni-caudal	0,215566483	
t crítico uni-caudal	1,761310115	
P(T<=t) bi-caudal	0,431132965	
t crítico bi-caudal	2,144786681	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	2742294,25	2779448,875
Variância	2466003248	2182099159
Observações	8	8
Variância agrupada	2324051203	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	-1,541416601	
P(T<=t) uni-caudal	0,072755368	
t crítico uni-caudal	1,761310115	
P(T<=t) bi-caudal	0,145510735	
t crítico bi-caudal	2,144786681	

Teste de homogeneidade de variâncias – teste F para o ácido láctico

Teste F – ácido láctico: duas amostras para variâncias desiguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.0</i>
Média	2742294,25	2754247,5
Variância	2466003248	5549570984
Observações	8	8
gl	7	7
F	0,444359259	
P(F<=f) uni-caudal	0,153315455	
F crítico uni-caudal	0,264058226	

Teste F – ácido láctico: duas amostras para variâncias iguais		
	<i>KH₂PO₄ pH=2.0</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	2754247,5	2779448,875
Variância	5549570984	2182099159
Observações	8	8
gl	7	7
F	2,543225848	
P(F<=f) uni-caudal	0,120642218	
F crítico uni-caudal	3,78704354	

Teste F – ácido láctico: duas amostras para variâncias iguais		
	<i>H₂O</i>	<i>KH₂PO₄ pH=2.8</i>
Média	2742294,25	2779448,875
Variância	2466003248	2182099159
Observações	8	8
gl	7	7
F	1,130105952	
P(F<=f) uni-caudal	0,437977961	
F crítico uni-caudal	3,78704354	

Curva de calibração do ácido acético



Untitled Report

Reported by User: System

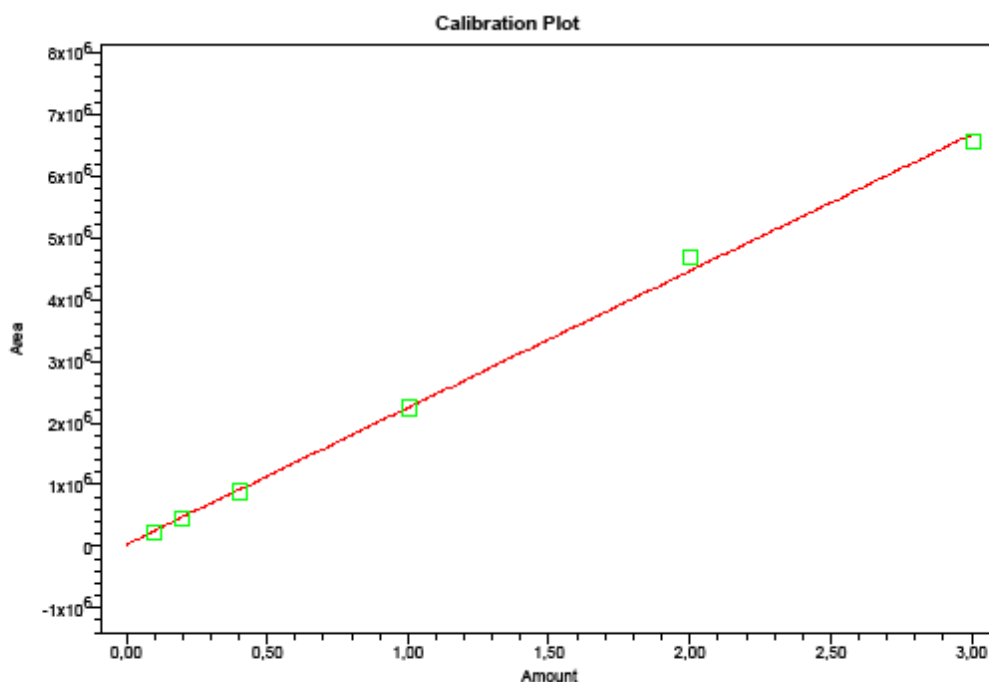
Project Name: acidos_organicos

Calibration Information

Name: acido acetico
System: LINHA2
Channel: Wvln Ch1
Fit Type: Linear (1st Order)

A: 2,855087e+004
B: 2,215333e+006
C: 0,000000e+000
D: 0,000000e+000
R^2: 0,998034

Calibration Id: 1789
Date Calibrated: 2012-02-22 11:03:00
Time: 7,187
Processing Method: ac_organicos_mp



Peak: acido acetico

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	acido acetico		0,100200	223438,260914	0,088875	-11,303	No	No
2	acido acetico		0,200400	447217,954758	0,189889	-5,245	No	No
3	acido acetico		0,400700	869409,734105	0,389494	-2,797	No	No
4	acido acetico		1,002000	2241165,728739	0,999676	-0,232	No	No
5	acido acetico		2,004000	4679015,383412	2,100120	4,796	No	No
6	acido acetico		3,005000	6549037,543319	2,944247	-2,022	No	No

Curva de calibração do ácido butírico



Untitled Report

Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

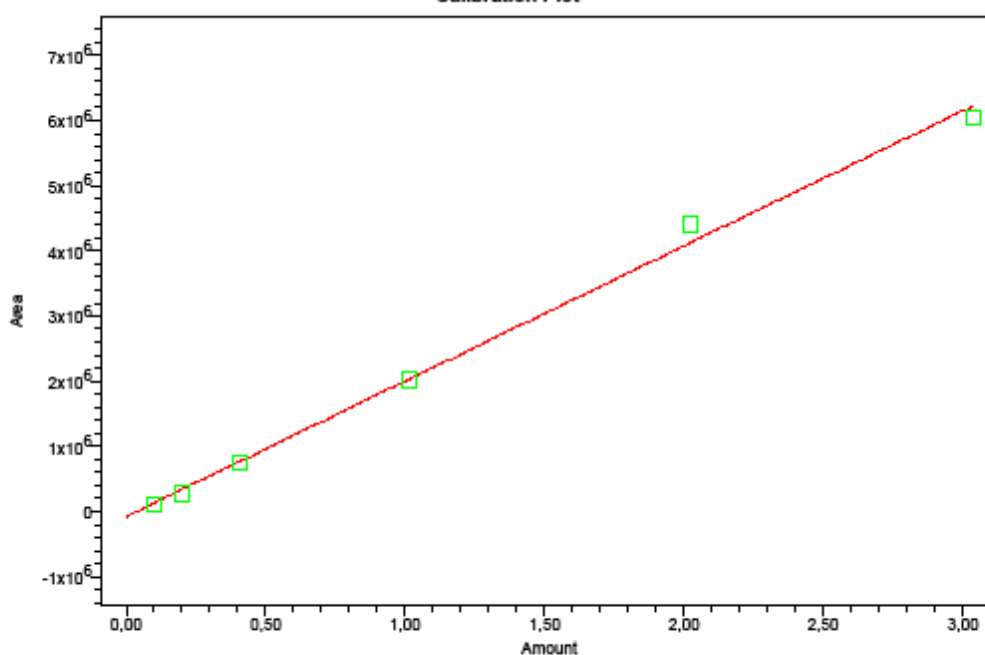
Calibration Information

Name: acido butirico
System: LINHA2
Channel: Wvln Ch1
Fit Type: Linear (1st Order)

A: -7,745870e+004
B: 2,074632e+006
C: 0,000000e+000
D: 0,000000e+000
R²: 0,995896

Calibration Id: 1789
Date Calibrated: 2012-02-22 11:03:00
Time: 30,560
Processing Method: ac organicos_mp

Calibration Plot



Peak: acido butirico

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	acido butirico		0,101000	110624,529062	0,090659	-10,239	No	No
2	acido butirico		0,202000	275099,345948	0,169938	-15,872	No	No
3	acido butirico		0,405000	745513,832440	0,396684	-2,053	No	No
4	acido butirico		1,012000	2024938,022663	1,013383	0,137	No	No
5	acido butirico		2,025000	4411386,899207	2,163683	6,849	No	No
6	acido butirico		3,037000	6037838,497849	2,947654	-2,942	No	No

Curva de calibração do ácido láctico



Untitled Report

Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

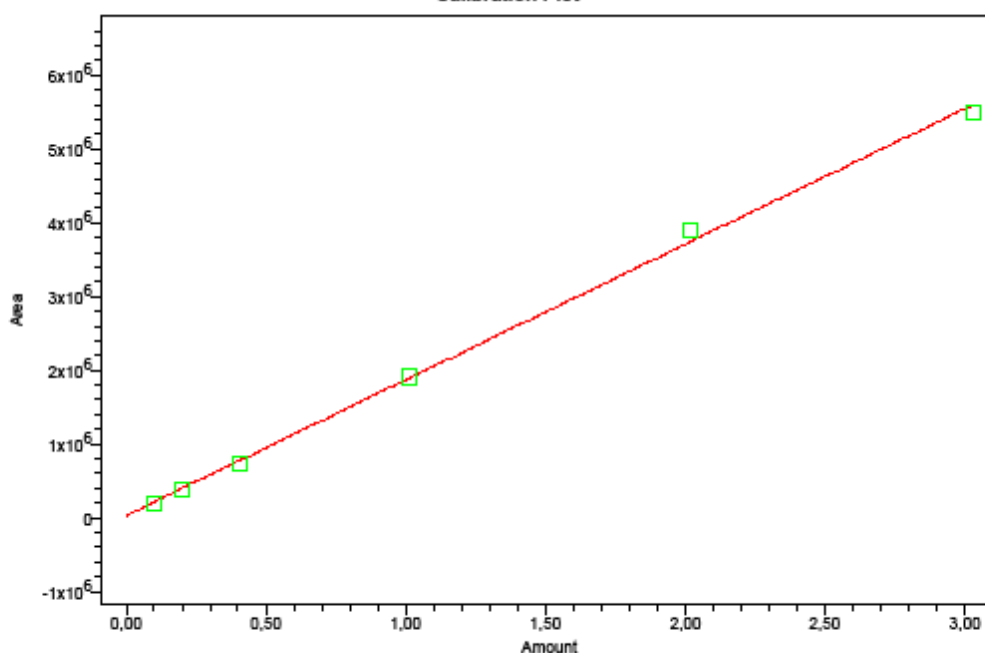
Calibration Information

Name: acido lactico
System: LINHA2
Channel: Wvln Ch1
Fit Type: Linear (1st Order)

A: 3,039487e+004
B: 1,837543e+006
C: 0,000000e+000
D: 0,000000e+000
R^2: 0,998382

Calibration Id: 1789
Date Calibrated: 2012-02-22 11:03:00
Time: 6,353
Processing Method: ac organicos_mp

Calibration Plot



Peak: acido lactico

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	acido lactico		0,101000	190830,089984	0,087310	-13,555	No	No
2	acido lactico		0,202000	382322,195726	0,191521	-5,188	No	No
3	acido lactico		0,404000	741430,938275	0,386949	-4,220	No	No
4	acido lactico		1,010000	1912886,180380	1,024461	1,432	No	No
5	acido lactico		2,020000	3897421,886206	2,104455	4,181	No	No
6	acido lactico		3,030000	5492134,253611	2,972305	-1,904	No	No

Curva de calibração do ácido oxálico



Untitled Report

Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

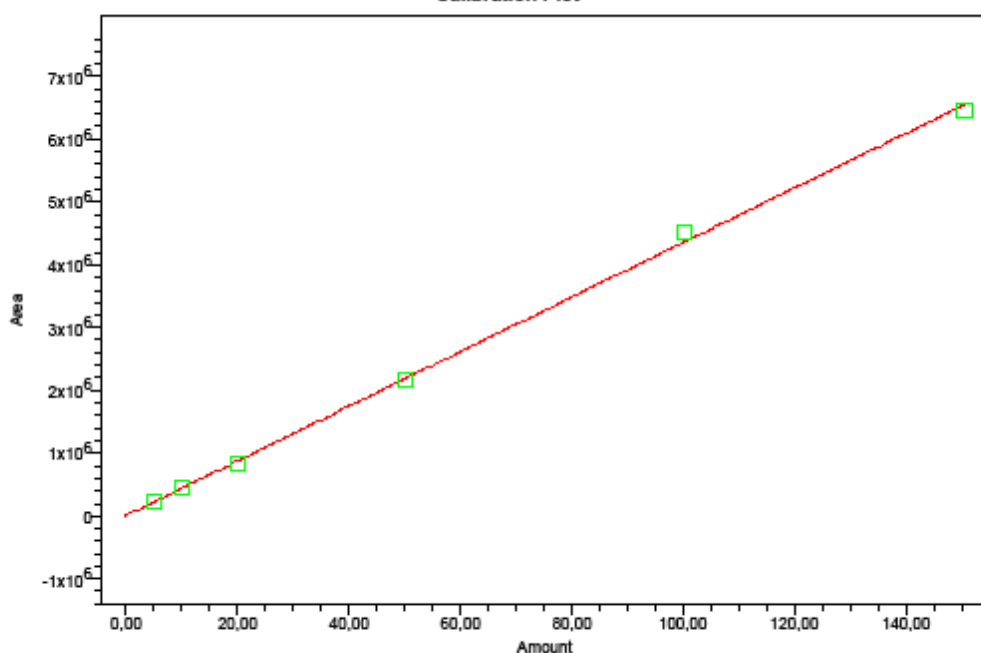
Calibration Information

Name: acido oxalico
System: LINHA2
Channel: Wvln Ch1
Fit Type: Linear (1st Order)

A: 5,909239e+003
B: 4,348380e+004
C: 0,000000e+000
D: 0,000000e+000
R^2: 0,998905

Calibration Id: 1789
Date Calibrated: 2012-02-22 11:03:00
Time: 4,475
Processing Method: ac organicos_mp

Calibration Plot



Peak: acido oxalico

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	acido oxalico		5,015000	230525,778919	5,167923	3,049	No	No
2	acido oxalico		10,030000	443825,042274	10,075461	0,453	No	No
3	acido oxalico		20,060000	825216,183700	18,850417	-6,030	No	No
4	acido oxalico		50,150000	2164368,980538	49,661322	-0,974	No	No
5	acido oxalico		100,300000	4519669,331385	103,851504	3,541	No	No
6	acido oxalico		150,450000	6455836,530080	148,398373	-1,364	No	No

Curva de calibração do ácido propiónico



Untitled Report

Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

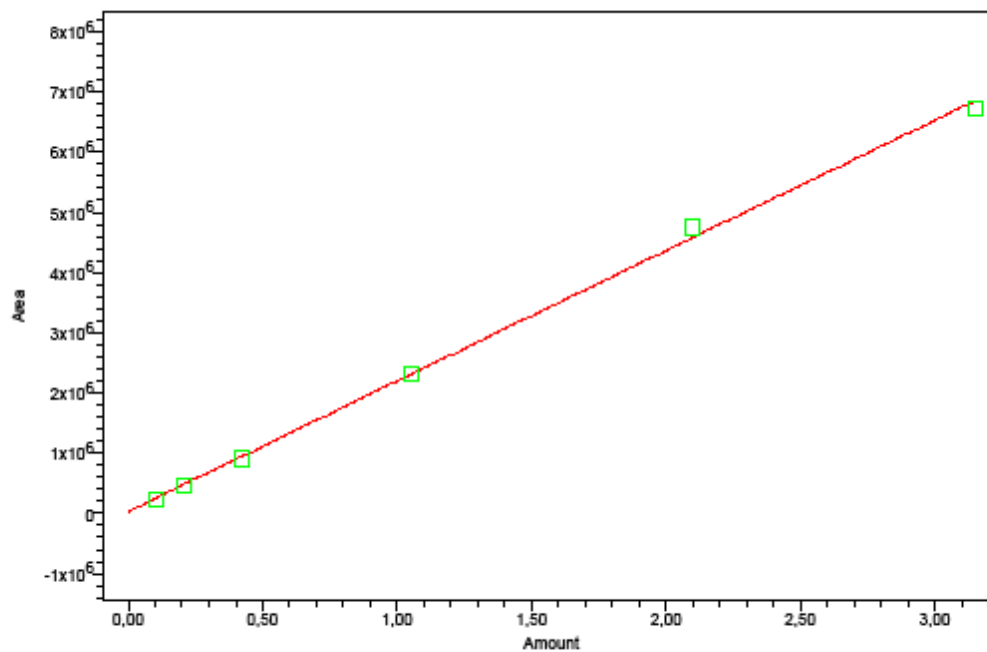
Calibration Information

Name: acido propionico
System: LINHA2
Channel: WIn Ch1
Fit Type: Linear (1st Order)

A: 2,513197e+004
B: 2,166489e+006
C: 0,000000e+000
D: 0,000000e+000
R^2: 0,998636

Calibration Id: 1789
Date Calibrated: 2012-02-22 11:03:00
Time: 12,947
Processing Method: ac organicos_mp

Calibration Plot



Peak: acido propionico

	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	acido propionico		0,105000	228464,945990	0,093855	-10,615	No	No
2	acido propionico		0,210000	460548,876709	0,200980	-4,295	No	No
3	acido propionico		0,420000	907824,712579	0,407434	-2,992	No	No
4	acido propionico		1,050000	2307974,052911	1,053715	0,354	No	No
5	acido propionico		2,100000	4754143,420500	2,182819	3,944	No	No
6	acido propionico		3,150000	6732947,711530	3,096197	-1,708	No	No

Cromatograma do ácido acético



Untitled Report

Reported by User: System

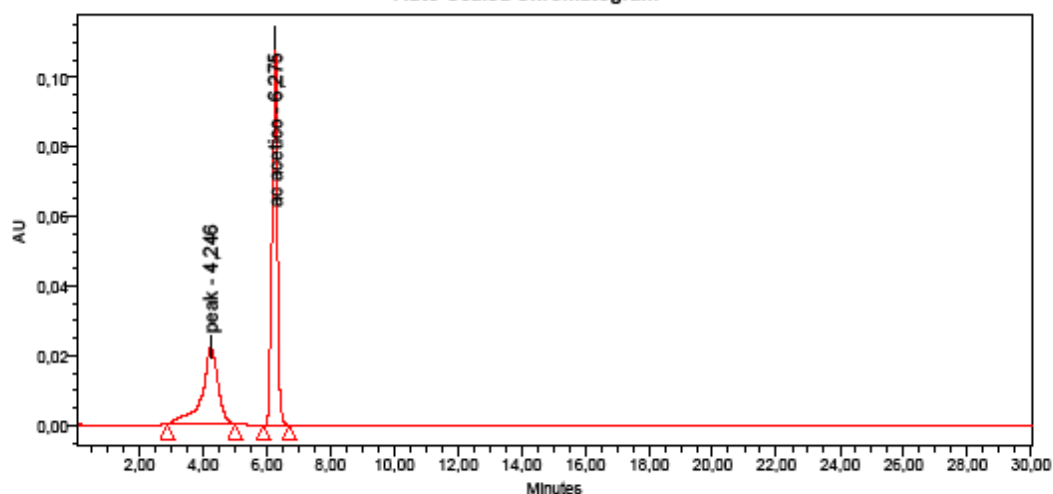
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: ac. acetico
Sample Type: Standard
Vial: 8
Injection #: 1
Injection Volume: 20,00 ul
Run Time: 30,0 Minutes
Sample Set Name: padroes acidos organicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2011-11-09 12:19:53
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2011-11-09 13:28:06
Processing Method: ac acetico_mp
Channel Name: Wwin Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	peak	4,246	782727	22140		
2	ac acetico	6,275	1219095	112441		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	peak	4,246	0,623	0,428	ac acetico	3,220	1,121
2	ac acetico	6,275	0,086	0,247	ac acetico	0,000	1,033

Cromatograma do ácido butírico



Untitled Report

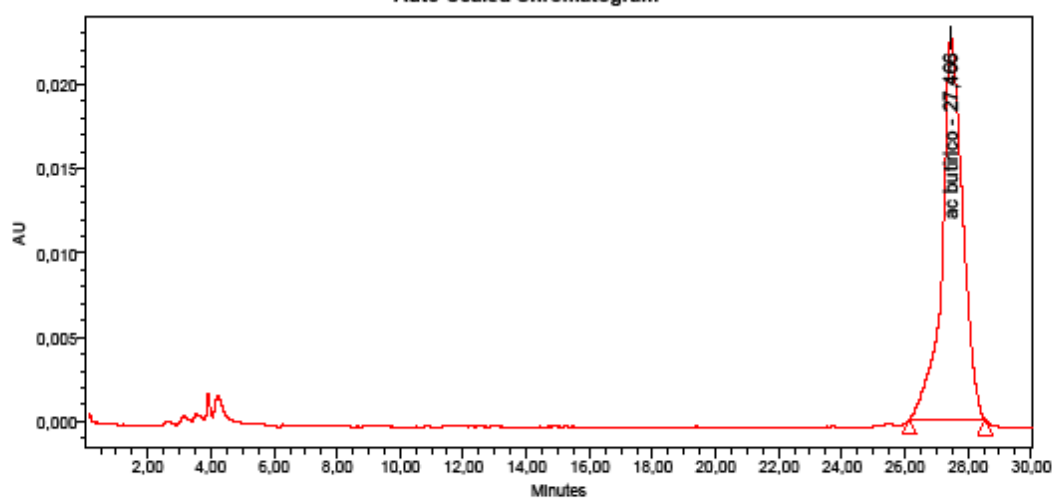
Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: ac. butirico	Acquired By: System
Sample Type: Standard	Date Acquired: 2011-11-09 13:22:05
Vial: 10	Acq. Method Set: ac organicos_ms
Injection #: 1	Date Processed: 2011-11-09 13:53:47
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: ac butirico_mp
Run Time: 30,0 Minutes	Channel Name: WWin Ch1
Sample Set Name: padroes acidos organicos	Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	ac butirico	27,466	1046394	22723		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	ac butirico	27,466	0,393	0,466	ac propionico	2,436	1,161

Cromatograma do ácido láctico



Untitled Report

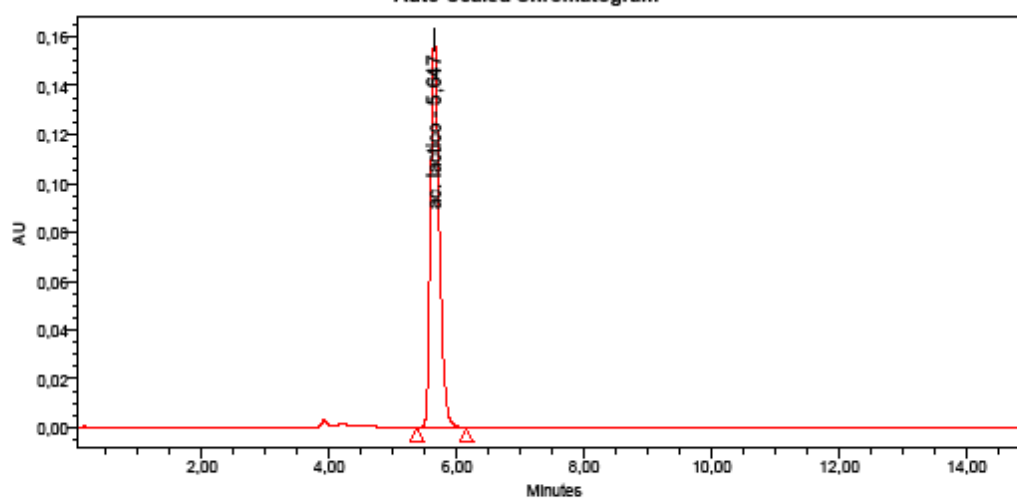
Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: ac. lactico	Acquired By: System
Sample Type: Standard	Date Acquired: 2011-11-09 12:03:46
Vial: 7	Acq. Method Set: ac organicos_ms
Injection #: 1	Date Processed: 2011-11-09 13:24:16
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: ac lactico_mp
Run Time: 15,0 Minutes	Channel Name: WWin Ch1
Sample Set Name: padroes acidos organicos	Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	ac. lactico	5,647	1531656	159990		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	ac. lactico	5,647	0,089	0,227	ac. citrico	1,789	1,026

Cromatograma do ácido oxálico



Untitled Report

Reported by User: System

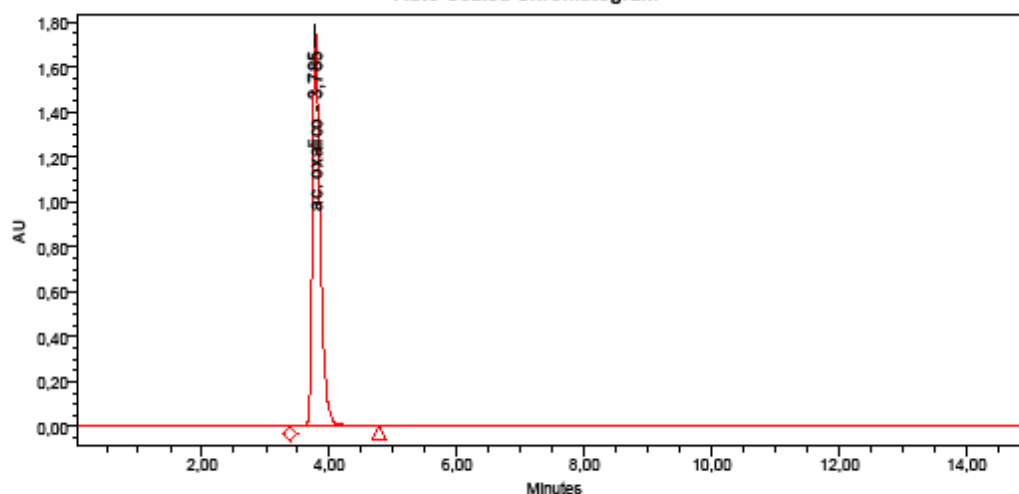
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: ac. oxalico
Sample Type: Standard
Vial: 2
Injection #: 1
Injection Volume: 20,00 ul
Run Time: 15,0 Minutes
Sample Set Name: padroes acidos organicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2011-11-09 10:43:15
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2011-11-09 12:08:11
Processing Method: ac oxalico_mp
Channel Name: Wwin Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	ac. oxalico	3,765	14976295	1766352		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	ac. oxalico	3,765	2,530	1,733	ac. oxalico	0,000	1,003

Cromatograma do ácido propiónico



Untitled Report

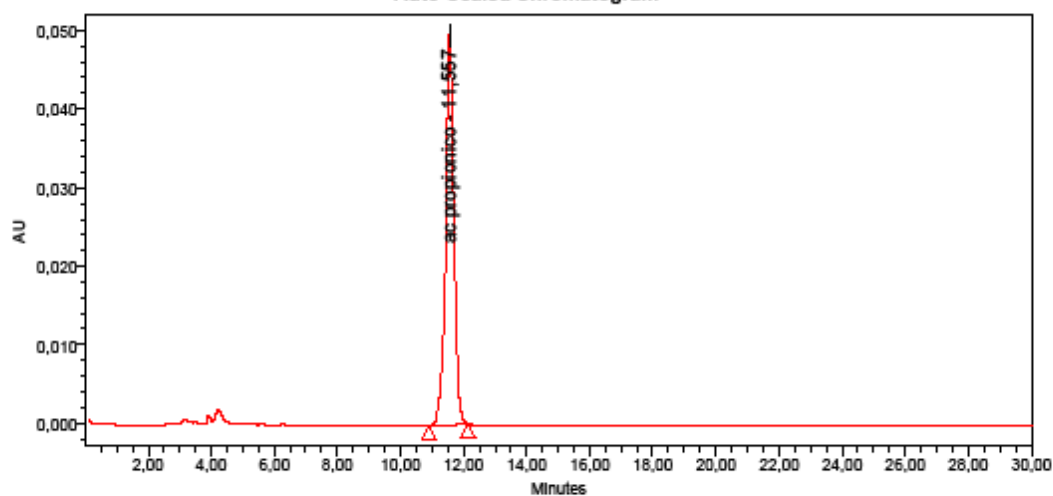
Reported by User: System

Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	ac. propionico	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	2011-11-09 12:50:58
Vial:	9	Acq. Method Set:	ac organicos_ms
Injection #:	1	Date Processed:	2011-11-09 13:30:46
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	ac propionico_mp
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	WIn Ch1
Sample Set Name:	padroes acidos organicos	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	ac propionico	11,557	900424	49604		

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	ac propionico	11,557	0,146	0,297	ac. succinico	1,556	1,079

Cromatograma do Padrão 1



Untitled Report

Reported by User: System

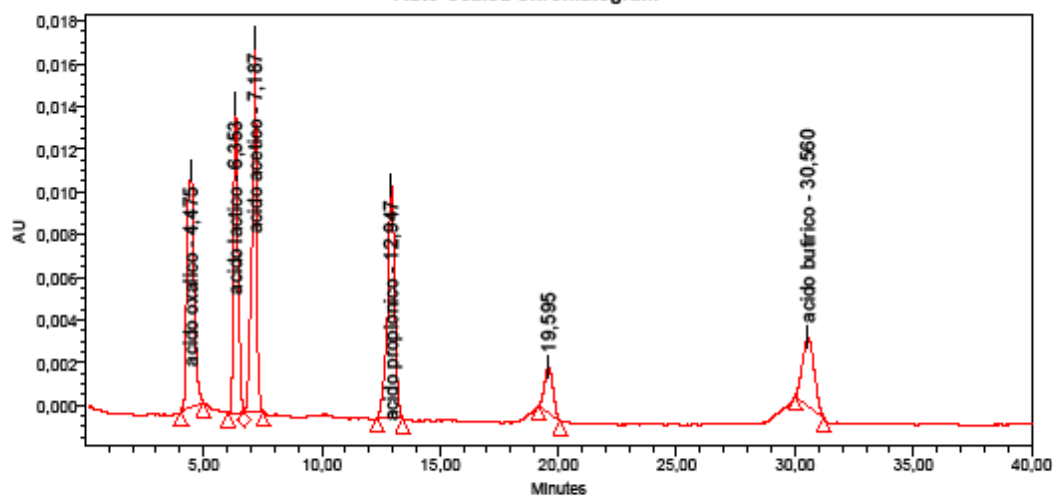
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 1 pH=2.8
Sample Type: Standard
Vial: 1
Injection #: 1
Injection Volume: 50,00 ul
Run Time: 40,0 Minutes
Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2012-02-21 11:23:28
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2012-02-22 11:02:34
Processing Method: ac organicos_mp
Channel Name: WIn Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxalico	4,475	230526	11099	5,015	ug/ml
2	acido lactico	6,353	190830	14510	0,101	mg/ml
3	acido acetico	7,187	223438	17594	0,100	mg/ml
4	acido propionico	12,947	228465	10871	0,105	mg/ml
5		19,595	52355	2146		
6	acido butirico	30,560	110625	3213	0,101	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido butirico	30,560	1,618	1,659	acido butirico	0,734	1,999
2		19,595	2,218	2,267	acido acetico	6,777	2,386
3	acido propionico	12,947	0,531	0,734	acido propionico	0,248	1,299

Cromatograma do Padrão 2



Untitled Report

Reported by User: System

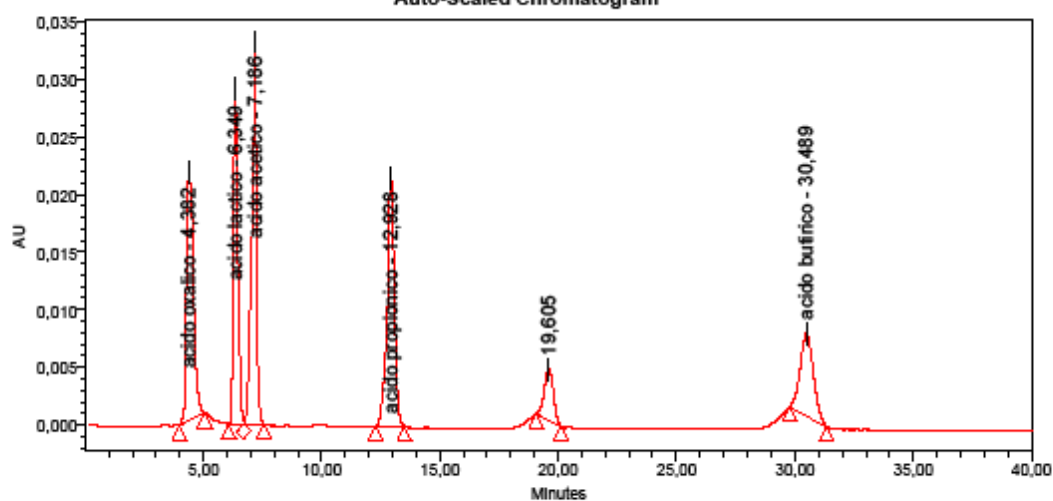
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 2 pH=2.8
Sample Type: Standard
Vial: 2
Injection #: 1
Injection Volume: 50,00 µl
Run Time: 40,0 Minutes
Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2012-02-21 12:05:04
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2012-02-22 11:02:37
Processing Method: ac organicos_mp
Channel Name: WWin Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxálico	4,382	443825	21629	10,030	ug/ml
2	acido láctico	6,349	382322	29242	0,202	mg/ml
3	acido acético	7,186	447218	33481	0,200	mg/ml
4	acido propionico	12,928	460549	21632	0,210	mg/ml
5		19,605	115969	4423		
6	acido butírico	30,489	275099	7104	0,202	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido butírico	30,489	0,707	0,632	acido butírico	0,482	1,413
2		19,605	0,824	1,152	acido acético	5,369	1,612
3	acido propionico	12,928	0,421	0,447	acido propionico	0,167	1,136

Report Method: Untitled

Printed 15:22:39

2012-02-28

Page: 1 of 2

Cromatograma do Padrão 3



Untitled Report

Reported by User: System

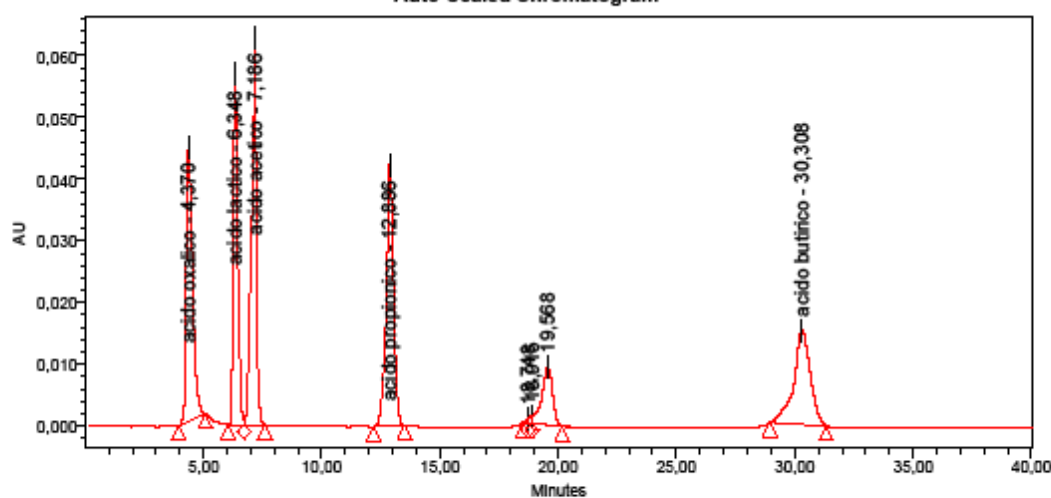
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 3 pH=2.8
Sample Type: Standard
Vial: 3
Injection #: 1
Injection Volume: 50,00 ul
Run Time: 40,0 Minutes
Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2012-02-21 12:48:41
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2012-02-22 11:02:41
Processing Method: ac organicos_mp
Channel Name: WIn Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxálico	4,370	825216	44808	20,060	ug/ml
2	acido láctico	6,348	741431	56879	0,404	mg/ml
3	acido acético	7,186	889410	62764	0,401	mg/ml
4	acido propiônico	12,886	907825	42399	0,420	mg/ml
5		18,748	4639	713		
6		18,915	10019	1265		
7		19,568	297164	9475		
8	acido butírico	30,308	745514	15279	0,405	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido butírico	30,308	0,450	0,502	acido butírico	0,125	1,184

Cromatograma do Padrão 4



Untitled Report

Reported by User: System

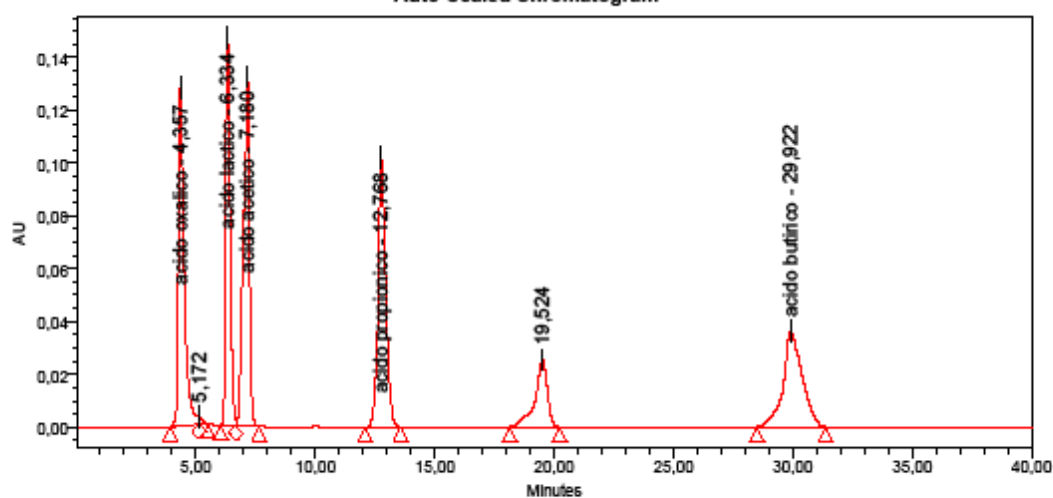
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 4 pH=2.8
 Sample Type: Standard
 Vial: 4
 Injection #: 1
 Injection Volume: 50,00 ul
 Run Time: 40,0 Minutes
 Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
 Date Acquired: 2012-02-21 13:28:17
 Acq. Method Set: ac organicos_ms
 Date Processed: 2012-02-22 11:02:45
 Processing Method: ac organicos_mp
 Channel Name: WIn Ch1
 Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxalico	4,357	2164369	128315	50,150	ug/ml
2		5,172	25141	3040		
3	acido lactico	6,334	1912886	147258	1,010	mg/ml
4	acido acetico	7,180	2241166	133775	1,002	mg/ml
5	acido propionico	12,768	2307974	102066	1,050	mg/ml
6		19,524	911238	25379		
7	acido butirico	29,922	2024938	36168	1,012	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido lactico	6,334	1,290	0,240	acido lactico	0,482	1,029
2		5,172	1,654	2,330			

Cromatograma do Padrão 5



Untitled Report

Reported by User: System

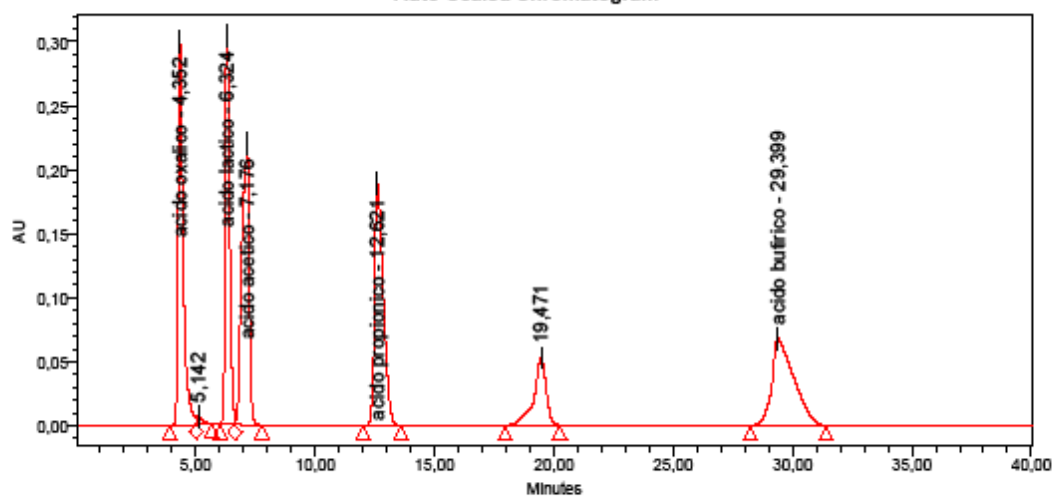
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 5 pH=2.8
Sample Type: Standard
Vial: 5
Injection #: 1
Injection Volume: 50,00 ul
Run Time: 40,0 Minutes
Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
Date Acquired: 2012-02-21 14:09:54
Acq. Method Set: ac organicos_ms
Date Processed: 2012-02-22 11:02:49
Processing Method: ac organicos_mp
Channel Name: WIn Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxálico	4,352	4519669	300679	100,300	ug/ml
2		5,142	109472	6435		
3	acido láctico	6,324	3897422	305481	2,020	mg/ml
4	acido acético	7,176	4679015	221754	2,004	mg/ml
5	acido propionico	12,621	4754143	189183	2,100	mg/ml
6		19,471	1913304	52930		
7	acido butírico	29,399	4411387	68017	2,025	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido butírico	29,399	0,126	0,261	acido butírico	0,024	1,060
2		19,471	0,120	0,294	acido acético	5,475	1,053

Report Method: Untitled

Printed 15:23:01 2012-02-28

Page: 1 of 2

Cromatograma do Padrão 6



Untitled Report

Reported by User: System

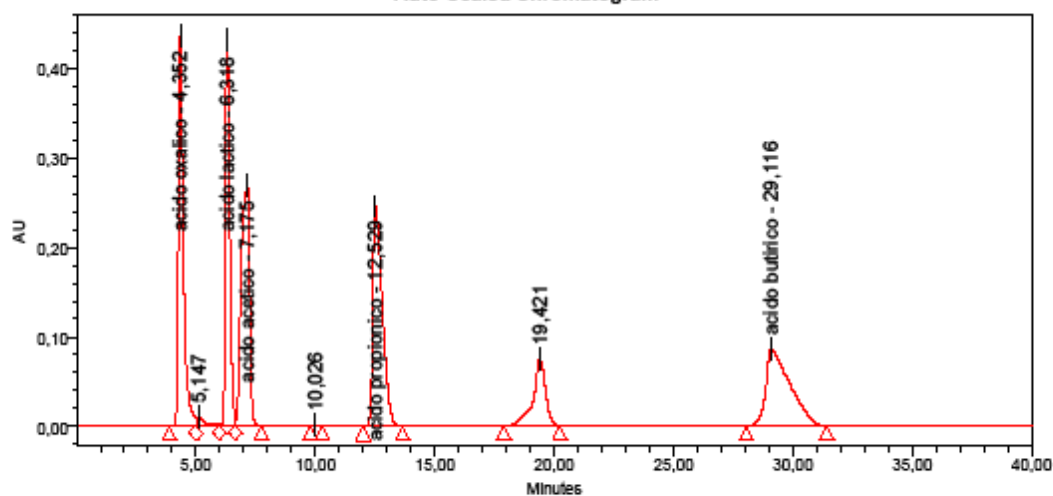
Project Name: acidos_organicos

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Padrão 6 pH=2.8
 Sample Type: Standard
 Vial: 6
 Injection #: 1
 Injection Volume: 50,00 ul
 Run Time: 40,0 Minutes
 Sample Set Name: Padrões ácidos orgânicos

Acquired By: System
 Date Acquired: 2012-02-21 14:51:33
 Acq. Method Set: ac organicos_ms
 Date Processed: 2012-02-22 11:02:53
 Processing Method: ac organicos_mp
 Channel Name: WWin Ch1
 Proc. Chnl. Descr.: PDA 210,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	acido oxalico	4,352	6455837	437808	150,450	ug/ml
2		5,147	235928	9768		
3	acido lático	6,318	5492134	432467	3,030	mg/ml
4	acido acético	7,175	6549038	270879	3,005	mg/ml
5		10,026	8848	609		
6	acido propionico	12,529	6732948	247306	3,150	mg/ml
7		19,421	2702735	74653		
8	acido butírico	29,116	6037838	85920	3,037	mg/ml

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Match1 Spect. Name	Match1 Angle	Match1 Threshold
1	acido oxalico	4,352	2,478	0,258	acido oxalico	0,199	1,011